UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE CHROMATOGRAPHISCHE AUFTRENNUNG VON SCHLAFMITTELGRUPPEN MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER TRENNUNG DER BARBITALE VON ANDEREN SEDATIVA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin 1961

vorgelegt von
Horst Weidmann
aus Leipzig

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE CHROMATOGRAPHISCHE AUFTRENNUNG VON SCHLAFMITTELGRUPPEN MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER TRENNUNG DER BARBITALE VON ANDEREN SEDATIVA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Weidmann
aus Leipzig

Erster Berichterstatter: Professor Dr. E. Vidic
Zweiter Berichterstatter: Professor Dr. G. Schenck
Dritter Berichterstatter: Professor Dr. R. Hänsel

UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 15.2.1961
Tag der Promotion : 27. Feb. 1961

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. E. VIDIC im Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Professor Dr. E. VIDIC, meinem sehr verehrten Lehrer, möchte ich an dieser Stelle für die mir in liebenswürdiger Weise stets gewährten wertvollen Ratschläge und für die fördernde Weiterbildung meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. W. KRAULAND, Direktor des Institutes für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin, danke ich besonders für die freundliche Aufnahme im Institut und für die Freistellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	9
B. Anwendung der Adsorptionschromatographie zur Trennung von Schlafmittelgruppen.....	12
I. Einführung und Besprechung der Literatur....	12
a.) Einleitung.....	12
b.) Vorgänge an den Adsorbentien	12
c.) Bisherige adsorptionschromatographische Arbeiten über Schlafmittel und andere wichtige Arzneistoffe.....	15
d.) Die Schlafmittelgruppen und ihre Adsorptionseigenschaften.....	17
II. Säulenchromatographische Trennungen mit Aluminiumoxyd	20
a.) Versuchsanordnung.....	21
α.) Herstellung der Aluminiumoxydsäule...	21
β.) Bestimmung der Substanzen im Eluat...	22
b.) Chromatographie an saurem Aluminiumoxyd..	22
1. Vorversuche.....	22
2. Äther als Solvens.....	25
α.) Untersuchungen an saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I.....	25
β.) Anwendung verschiedener Aktivitätsstufen.....	25
γ.) Untersuchungen nach Vorbehandlung des Aluminiumoxyds mit Essigsäure.....	27
3. Chloroform als Solvens.....	29
α.) Untersuchungen an saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I.....	29
β.) Untersuchungen mit Alkoholzusatz zum Lösungsmittel.....	30
γ.) Anwendung verschiedener Aktivitätsstufen.....	31
c.) Chromatographie an basischem Aluminiumoxyd	33
1. Vorversuche.....	34
2. Äther als Solvens.....	34

Seite

α.) Untersuchungen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.I..... 34
β.) Verwendung verschiedener Aktivitätsstufen..... 35
γ.) Untersuchungen mit stärker polarem Lösungsmittel..... 37
3. Chloroform als Solvens..... 38
d.) Betrachtungen zu den neu ermittelten adsorptionschromatographischen Trennverfahren und zur Chromatographie an Aluminiumoxyd..... 41
C. Verteilungschromatographie zur Trennung von Schlafmittelgruppen 47
I. Einführung und Besprechung der Literatur..... 47
a.) Einleitung.....l..... 47
b.) In der Literatur verzeichnete verteilungschromatographische Verfahren zur Trennung von Schlafmitteln..... 48
1. Verteilungschromatographie an Säulen zur Trennung von Barbitalen und anderen wichtigen Arzneistoffen..... 48
2. Die wichtigsten papierchromatographischen Trennungen der Schlafmittel..... 50
c.) Diskussion der verteilungschromatographischen Möglichkeiten an der Säule..... 51
II. Verteilungschromatographische Untersuchungen an Säulen..... 53
a.) Untersuchungen zur Festlegung der variablen Größen der Verteilungschromatographie..... 53
1. Auswahl des Lösungsmittels..... 53
2. Festlegung des optimalen pH für die stationäre Phase..... 55
3. Betrachtungen über weitere variable Größen der Säulenverteilungschromatographie. 59
b.) Verteilungschromatographische Untersuchungen zur Trennung der Schlafmittelgruppen an Kieselgel-Säulen..... 61

Seite

1.Versuchsanordnung..... 61
2.Untersuchungsergebnisse..... 62
α.) Feststellung der günstigsten Trennungsbedingungen..... 62
β.) Trennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen an Kieselgel 65
c.) Verteilungschromatographische Untersuchungen zur Trennung der Schlafmittelgruppen an Zellulose-Säulen..... 67
1. Versuchsanordnung..... 67
α.) Herstellung der Säulen..... 67
β.) Allgemeine Versuchsbedingungen..... 68
2.Untersuchungsergebnisse..... 69
α.) Feststellung der optimalen Bedingungen 69
β.) Trennung der Barbitale von den anderen Sedativa durch Entwicklung mit einem Lösungsmittel..... 71
γ.) Trennung der Barbitale von den anderen Sedativa durch Entwicklung mit zwei Lösungsmitteln..... 73
δ.) Auftrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel..... 76
ε.) Trennung von Medomin, Cyclopal, Phanodorm und Noctal von Luminal und Veronal 81
3.Neues Verfahren der verteilungschromatographischen Auftrennung der Schlafmittelgruppen an Zellulose-Säulen..... 84

D. Säulenchromatographische Trennungen der Abbauprodukte der Schlafmittel von den unveränderten Substanzen..... 91
a.) Einleitung..... 91
b.) Untersuchungsergebnisse..... 93
1. Extraktion und Reinigung..... 93
2. Untersuchungen zur Abtrennung der Abbauprodukte der Schlafmittel von den unveränderten Substanzen an Zellulose-Säulen 96

Seite

E. Dünnschichtchromatographie zur Trennung der Schlafmittelgruppen..... 101

a.) Einleitung..... 101
b.) Praktische Untersuchungen..... 102
1. Herstellung der Kieselgelplatten..... 102
2. Detektion der Substanzen..... 102
3. Trennungsverfahren für die Schlafmittelgruppen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie..... 106

F. Neuer Analysengang zur chromatographischen Auftrennung der Schlafmittelgruppen an Säulen..... 113

Zusammenfassung..... 118

Literaturverzeichnis..... 122

Lebenslauf..... 130

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546826_0046

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen bilden die Barbitursäurederivate einen großen Teil aller Vergiftungen (SCHMIDT). Im Laufe der letzten Jahre ist es aber auch infolge eines steigenden Mißbrauches an barbitursäurefreien Schlafmitteln, vor allem aus der Hydropyridin- und Piperidinreihe (Persedon und Noludar) sowie des α-Phenyl-α-äthylglutarsäureimid (Doriden) teilweise zu schweren Vergiftungen gekommen.

Es ist somit festzustellen, daß der Nachweis der Sedativa aus der Gruppe der leichter zugänglichen Nichtbarbitale infolge des Erscheinens einer Reihe neuer Präparate im Arzneiverkehr zunehmend häufiger zu führen ist (VIDIC - 1959; PRIBILLA).

Da weiterhin eine Reihe von Kombinationspräparaten mit Barbitalen und Sedativa anderer Gruppen in pharmazeutischen Präparaten vorliegen, die auch mißbräuchlich angewendet werden können, ist es zur sicheren toxikologischen Begutachtung daher notwendig geworden, die einzelnen Wirkstoffe der Schlafmittel spezieller zu erfassen.

Nach der Extraktion der Wirkstoffe aus biologischem Material oder aus pharmazeutischen Zubereitungen ist die Auftrennung in die einzelnen Komponenten ein Hauptproblem. In gewissen Fällen können zur Trennung der Substanzen systematische Ausschüttelungsmethoden, fraktionierte Kristallisation oder fraktionierte Destillation zum Ziel führen und werden, soweit dieses durch einen gewissen chemischen Unterschied der Substanzen möglich ist, auch vielfach in den Trennungsgängen beschrieben und angewandt. Bei chemisch näher verwandten Substanzen reichen diese Trennungsmethoden zu ihrer Auftrennung nicht aus; sie besitzen nicht die nötige quantitative Trennschärfe, sind zeitraubend oder versagen ganz. Im organischen Analysengang ist es daher möglich, daß näher verwandte Substanzen oder Gruppen nicht quantitativ voneinander abgetrennt werden können, so daß sie in geringen Mengen auch in den späteren Abschnitten des Ganges anfallen und damit andere Einzelnachweise erschweren oder gar unmöglich machen.

Eine wesentliche Erleichterung und Bereicherung der Tren-

nungsmethoden brachte die Einführung der Adsorptions- und der Verteilungschromatographie sowie die Ionenaustauschchromatographie.

Die Extraktions- und Trennungsverfahren der Schlafmittel gehen zum größten Teil zurück auf die bei der Abtrennung von Arzneistoffgemischen gemachten Erfahrungen und Erkenntnisse von STAS-OTTO; BAMANN-ULLMANN; MÜHLEMANN-BÜRGIN; ROSENTHALER; WINTERFELD; DIETZEL und TUNMANN; GADAMER; SABALITSCHKA; STAUDINGER; AUTENRIETH und BAUER.

In der praktischen Anwendung hat sich zum Nachweis der Schlafmittel vor allem das von BÜCHI und PERLIA angewandte Ausschüttelungsverfahren mit 2 %iger Sodalösung bewährt, wobei die Barbitale nur zu 1-2 % im Äther verbleiben.

VIDIC (1959) führte die Untersuchungen mit demselben Ausschüttelungsgang weiter und untersuchte die quantitativen Bedingungen zur Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitursäurederivaten. Dabei wurde festgestellt, daß bei mehrmaliger Ausschüttelung des Ätherextraktes mit 2 %iger Natriumkarbonatlösung zur Abtrennung der Barbitale die barbitursäurefreien Substanzen hauptsächlich im Äther verbleiben, daß aber bei den Wirkstoffen von Bromural, Noludar und Persedon Substanzverluste von 10-20 % auftraten.

Die Ausschüttelungsmethode des Äthers mit Natriumkarbonatlösung zur Abtrennung der Barbitale von den anderen Sedativa besitzt somit nicht für alle Substanzen die absolute Trennschärfe und Sicherheit, die für eine quantitative Aussage und Identifizierung notwendig sind.

Da bei der forensisch-toxikologischen Untersuchung meist ein Hinweis auf das in Frage kommende Mittel fehlt, ist es im besonderen Maße erforderlich, daß die Gruppen bzw. Substanzen quantitativ abgetrennt werden.

Hierdurch wäre eine weitere wesentliche Erleichterung und Sicherung der spektrophotometrischen Untersuchungen (GOLDBAUM; PAULUS und PRIBILLA; GOLDSCHMIDT; LAMPRECHT und HELMREICH) und die üblichen Identifizierungsverfahren der Schlafmittel, wie Schmelzpunktsbestimmungen, kristallchemische Methoden und Farbreaktionen (BÜCHI und PERLIA; STREBEL; LÜDY-TENGER; LANG und STEPHAN; KAISER und LANG; VÖLKSEN) gegeben, sowie eine quan-

titative Auswertung der Ergebnisse möglich.

Innerhalb der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa und der Barbitale konnten bis jetzt durch Ausschüttelungsmethoden mit Lösungen verschiedener pH-Abstufungen noch keine Abtrennungen einzelner Gruppen oder Substanzen erreicht werden, und eine Trennung von geringen Substanzmengen (100 γ) war nur mit Hilfe der Papierchromatographie möglich.

Aus diesen angeführten Gründen erschien es daher sehr erwünscht, die chromatographischen Trennungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit zur Auftrennung von Schlafmittelgruppen zu untersuchen und vor allem eine quantitative Trennung zwischen den Barbitalen und der Gruppe der barbitursäurefreien Substanzen zu schaffen.

Zur Lösung des Problems sollten die Adsorptions- und die Verteilungschromatographie auf Säulen, die in schon sehr vielen Fällen mit Erfolg zur Trennung von anderen Substanzgemischen angewandt wurden, herangezogen werden.

Das säulenchromatographische Verfahren wurde deshalb gewählt, um die aus biologischem Material in mg-Mengen (10-30 mg) isolierten Schlafmittel nach der Auftrennung zur Wägung bringen zu können.

Bei den toxikologischen Untersuchungen von Schlafmittelvergiftungen ist ferner eine Abtrennung der Abbauprodukte der Schlafmittel von den unveränderten Substanzen, die durch Ausschüttelungsmethoden zum Teil erreicht werden konnte, von Bedeutung. Es sollten daher auch Untersuchungen dahingehend geführt werden, inwieweit sich die erhaltenen Ergebnisse der Ausschüttelung für eine chromatographische Trennung auf der Säule auswerten lassen.

Bei der Entwicklung eines neuen chromatographischen Verfahrens zur Auftrennung der Schlafmittelgruppen mußte im Hinblick auf die Erfordernisse der forensischen Toxikologie neben einer einfachen Durchführbarkeit eine sichere Reproduzierbarkeit und die exakte quantitative Abtrennung der Gruppen im Vordergrund stehen.

B. ANWENDUNG DER ADSORPTIONSCHROMATOGRAPHIE ZUR TRENNUNG VON SCHLAFMITTELGRUPPEN

I. Einführung und Besprechung der Literatur

a.) Einleitung

Das älteste chromatographische Verfahren, die Adsorptionschromatographie, wurde zu Beginn des Jahrhunderts von TSWETT zur Trennung von Pflanzenfarbstoffen entwickelt. Erst 1931 griffen KUHN, LEDERER, WINTERSTEIN und BROCKMANN dieses Trennverfahren wieder auf, zeigten die große Bedeutung des Verfahrens von neuem und regten seine Anwendung auf andere Stoffklassen an. Die Adsorptionschromatographie hat durch den Eingang in alle Gebiete der Chemie eine Fülle von Methoden hervorgebracht, die in der Wahl der Adsorbentien, der Lösungsmittel und der Durchführung eine große Variationsbreite bieten.

Der Bedeutung dieses Verfahrens entsprechend hat die diesbezügliche Literatur einen solchen Umfang angenommen, daß in diesem Rahmen nur die wichtigsten zusammenfassenden Darstellungen von ZECHMEISTER und CHOLNOKY; HESSE; STRAIN; LEDERER; RÖCK; HOPPE-SEYLER-THIERFELDER und TURBA hervorgehoben werden können.

Verschiedene wichtige Übersichtsreferate in Zeitschriften über Erkenntnisse der Adsorptionschromatographie vor allem von HESSE; LÜDDE; LENNARTZ; SANSONI; DALTON und BRADBURY wurden zur Einarbeitung eingesehen.

Einzelheiten aus den oben angeführten Schriften oder aus spezielleren Monographien über die theoretischen und technischen Grundlagen bei der adsorptionschromatographischen Trennung finden bei auftauchenden Problemen entsprechende Erwähnung.

b.) Vorgänge an den Adsorbentien

Es soll hier kurz auf den Wirkungsmechanismus der Adsorptionschromatographie vor allem in Bezug auf das hydrophile Adsorbens Aluminiumoxyd eingegangen werden.

Nach HESSE (1947) muß unterschieden werden zwischen einer "echten" Adsorption, die auch "van der Waal'sche" oder "apo-

lare" Adsorption genannt wird, und einer "Austausch-" oder "polaren Adsorption.

Bei der "echten" Adsorption tritt eine Absättigung der freien Kräfte an der Oberfläche des Adsorptionsmittels ein. Nach KARRER handelt es sich um eine Nebenvalenzbindung, dabei werden die Moleküle eines Stoffgemisches entsprechend ihrer Adsorptionsaffinität festgehalten. Beim Entwickeln einer Adsorptionssäule werden die Substanzen reversibel in der Reihenfolge ihrer verschiedenen Affinität zum Adsorbens gebunden und so voneinander getrennt.

Für die Adsorptionsaffinität sind das Grundgerüst und die Substituenten einer Substanz entscheidend. Die Stärke der adsorptiven Bindung eines organischen Stoffes an das Adsorptionsmittel hängt vor allem von der Art und Zahl der polaren Gruppen im Molekül ab. Die Lage der polaren Gruppen im Molekül und auch die Größe der Moleküle sowie sterische Verhältnisse sind ebenso für die Adsorptionsstärke von Bedeutung.

Wichtig für die Adsorption ist auch die Affinität des Lösungsmittels zum Adsorbens, da an der Oberfläche eine Verdrängung zwischen adsorbiertem Stoff und Lösungsmittel je nach der Affinität eintreten kann. Es wurde festgestellt, daß polare Lösungsmittel selbst stark adsorbiert werden. Man benützt deshalb zur Elution von Substanzen, die aus schwächer polarer Lösung adsorbiert wurden, polare Lösungsmittel. Aus diesen Erwägungen ergibt sich die eluotrope Reihe der Lösungsmittel (HESSE; GABON), die mit unpolaren Flüssigkeiten (Kohlenwasserstoffen) beginnt, dann über Äther und Aceton zu den Alkoholen und zum Schluß zum Wasser und Pyridin führt. Weiterhin eine Reihe der funktionellen Gruppen, die die Adsorptionsaffinität erhöhen und nachstehende Folge haben: Oxyalkyl,=CO,-NH_2,-OH, -COOH (BROCKMANN und VOLPERS).

Bei der "van der Waal'schen" Adsorption ist es theoretisch nicht notwendig, daß hierbei ein Austausch der Ionen eintritt. Doch ist man heute zu der Auffassung gekommen, daß neben der Oberflächenbindung Verdrängungs- und Austauschvorgänge nebenherlaufen können. Übergangserscheinungen werden nach BROCKMANN auch dadurch ermöglicht, daß die an der Oberfläche der dipolartigen Adsorbentien vorhandenen elektrischen Felder fähig

sind, unpolare Verbindungen durch Induktion zu polarisieren.

Über die Adsorptions-Abweichungen bei Stoffen, die zur Salzbildung fähig sind, berichten HESSE und SAUTER. In solchen Fällen kommt eine zusätzliche Bindung an das Adsorbens hinzu, die pH-abhängig ist und als Salzbildung auf der Säule oder als Austauschadsorption zu werten ist.

Die Austauschvorgänge an Aluminiumoxyd werden durch die verschiedenen Eigenschaften des Adsorbens ermöglicht. Je nach der Herstellung und Vorbehandlung werden saure, neutrale und alkalische Aluminiumoxyd-Präparate erhalten.

Wird Aluminiumhydroxyd, das Reste von Natriumkarbonat enthält, durch Erwärmen entwässert, so wirkt das Karbonat auf das entstehende Oxyd ein und bildet auf seiner Oberfläche Zentren von Natriumaluminat. Nach SCHWAB und JOCKERS können die Natriumionen von anderen Kationen verdrängt und somit ausgetauscht werden. Für den Eintritt des Austausches ist die Verdrängungsfähigkeit einerseits und die Verdrängbarkeit andererseits der Ionen entscheidend. Diese Fähigkeiten sind von der Ladungsstärke und dem Radius der Ionen abhängig.

KUBLI konnte noch eine weitere Möglichkeit, die sich an dem basischen Aluminiumoxyd ergibt, aufzeigen. Nach seinen Untersuchungen enthalten die alkalischen Aluminiumoxyde noch eine beträchtliche Menge von Natriumkarbonat. Daher ist es möglich, daß nicht nur eine Adsorption und Ionenaustausch stattfindet, sondern vielmehr die Kationen als Karbonate, die sich dann sekundär zu Hydroxyden oder basischen Salzen hydrolysieren können, ausgefällt werden.

Eine Säurebehandlung vor dem Trocknen des Aluminiumhydroxyds entfernt das Alkalikarbonat größtenteils; man erhält beim Glühen ein annähernd neutrales Präparat. Wird ein alkalisches Aluminiumoxyd mit Säure vorher behandelt, so treten an Stelle der Aluminatzentren anionische Zentren, die die Anionen verschiedener Säuren mehr oder weniger fest zu binden vermögen.

Bei der Entwicklung der Stoffe in wäßrigen oder wäßrig-alkoholischen Lösungen sind bei basischem und saurem Aluminiumoxyd vor allem Austauschvorgänge neben einer echten Adsorption

zu berücksichtigen. Im organischen Medium kommt es bei den drei verschiedenen Aluminiumoxyden vorwiegend zu einer echten Adsorption der Substanzen, wobei Austauschbindungen hinzukommen können (HESSE, DANIEL und WOHLLEBEN).

c.) Bisherige adsorptionschromatographische Arbeiten über Schlafmittel und andere wichtige Arzneistoffe

Die in der Literatur angeführten adsorptionschromatographischen Arbeiten über Schlafmittel beziehen sich vor allem auf Reinigungsmöglichkeiten der Substanzen aus biologischem Material und beschränken sich zumeist nur auf die Barbitale (PAULUS und MALLACH; de TIÈGE-ROBINET und LAPIERE).

FISCHER und IWANOFF untersuchten mit Modellversuchen mehrere Schlafmittelsubstanzen hinsichtlich ihrer Adsorbierbarkeit an verschiedenen Adsorbentien. Aus ihren Ergebnissen ist zu entnehmen, daß mit Aluminiumoxyd bei Anwendung von Chloroform oder Äther die meisten Schlafmittel adsorbiert werden, während vergleichsweise an anderen Adsorbentien wie Kohle, Calciumkarbonat, Bolus und Talcum keine Adsorption stattfindet.

Bis jetzt wurde noch keine adsorptionschromatographische Trennung von Schlafmittelgruppen durchgeführt.

VALENTIN wies schon vor Jahren auf die Notwendigkeit hin, chromatographische Verfahren in den Analysengang zur Feststellung von organischen Arzneimitteln einzuführen und vor allem Trennungen zwischen Adalin, Bromural und den organischen Säuren zu schaffen.

VALENTIN und KIRCHHÜBEL (1951) wandten sich diesen Aufgaben zu, doch nur zur Trennung von starken organischen Säuren. Hierbei wird das Aluminiumoxyd nach Brockmann mit einer ätherischen Lösung von Eisen-III-chlorid getränkt. Nach Einfüllen des getrockneten Adsorptionsmittels in das Chromatogrammrohr ergeben organische Stoffe (Salicyl- und Gallussäure), die mit Eisen-III-Salzen unter Farbbildung reagieren, beim Entwickeln gut sichtbare Zonen. Stoffe, die mit der präparierten Säule keine Farbzone ergeben (Benzoe- und Zimtsäure), befinden sich im Eluat, wenn mit Äther die Farbzone bis zum unteren Rand

der Säule entwickelt wird. VALENTIN und KIRCHHÜBEL (1952) berichten weiterhin, daß es sich bei der Isolierung der organischen Säuren zeigte, daß ein Ersatz der am Benzolring befindlichen substituierten H-Atome durch OH-Gruppen zu einer Steigerung der Adsorptionsaffinität führt.

VALENTIN und LUTHARDT (1954) führten Untersuchungen zur Trennung mehrwertiger Phenolgemische durch und konnten Brenzcatechin und Pyrogallol von Resorcin, Hydrochinon und Phloroglucin abtrennen. Im Jahre 1955 trennten diese Autoren halbquantitativ wichtige ein- und mehrwertige Phenole von Salicylsäure.

Die durchgeführten chromatographischen Untersuchungen zur Auftrennung von Substanzgemischen der sauren Gruppe des organischen Analysenganges haben sich somit nur auf starke Säuren und schwach sauer reagierende Phenole beschränkt. Mit einer Auftrennung der Schlafmittel in die Gruppe der Barbitale und die der barbitursäurefreien Substanzen könnte ein wesentlicher Fortschritt im Trennungsgang der organischen Stoffe erreicht werden.

Weiterhin wurden die wichtigsten chromatographischen Verfahren der Alkaloidtrennungen und Isolierungen eingesehen. MERZ und FRANK wandten die Adsorptionschromatographie zur Isolierung der Alkaloide aus Arzneizubereitungen an. Von Bedeutung ist der Befund, daß bei Tinkturen und Extraktlösungen nach Chromatographie an Aluminiumoxyd die Alkaloidbasen erhalten werden. Die Alkaloidsalze, denn als solche liegen die Alkaloide in diesen galenischen Zubereitungen vor, werden also während des chromatographischen Verfahrens zerlegt.

Mit der quantitativen chromatographischen Bestimmung von Alkaloidsalzen befaßten sich van OS; REIMERS, GOTTLIEB und CHRISTENSEN. BROWNLEE bestimmte die Alkaloide von Belladonna, Strammonium und Nux vomica; FISCHER und FRANK bearbeiteten Colchicum und Hydrastis; CHRISTENSEN isolierte Strychnin aus Tinktur und Extrakt. Die Methoden dürften jedoch schwer reproduzierbar sein, da noch kein genau definiertes Aluminiumoxyd verwandt wurde.

FISCHER und BUCHEGGER trennten Strychnin neben Brucin auf einer Aluminiumoxyd-Säule. TUNMANN und HUBMANN untersuchten

das Verhalten von Alkaloidbasen in Chloroform-Lösungen an saurem Aluminiumoxyd. BÖHME und STROHECKER berichten über eine chromatographische Methode an Aluminiumoxyd "Woelm" zur Bestimmung von Morphin (1953a) und zur Trennung von Morphin, Kodein und Papaverin (1953b). Eine ähnliche Trennung gelang LEVI und CASTELLI, die Morphin von Papaverin trennten.

Weiterhin sind Arbeiten über das Verhalten von Alkaloidsalzen an Aluminiumoxyd-Säulen von BÖHME und LAMPE; BÖHME und STROHECKER (c); GRAF; THIES und Zauner erschienen. Die Autoren stellten fest, daß neben einer echten Adsorption noch Ionenaustausch stattfindet und legten die Bedingungen fest, nach denen man zu ihrer Gehaltsbestimmung aus Extrakten, Tinkturen und Drogen reproduzierbare Ergebnisse erzielen kann.

Für die forensisch-toxikologischen Untersuchungen ist die säulenchromatographische Isolierung und Reinigung von Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphorsäureester (E 605) aus biologischem Material mit basischem Aluminiumoxyd "Woelm" nach VIDIC (1958) von besonderer Bedeutung.

Auf ein älteres Verfahren von KONDO sei noch verwiesen. Der Autor trennte ein Gemisch von Pyramidon und Veronal auf einer Aluminiumoxyd-Säule, wobei mit Benzol entwickelt wurde. Das Pyramidon wandert hierbei in das Eluat, während sich das Veronal in den oberen Bezirken der Säule ansammelt und mit Alkohol eluiert wird.

Bezüglich weiterer zusammenfassender Darstellungen der Anwendungsgebiete von chromatographischen Adsorptionsverfahren sei auf die Veröffentlichungen von VALENTIN; WOHLLEBEN (1957); WOELM hingewiesen.

d.) Die Schlafmittelgruppen und ihre Adsorptionseigenschaften

Für die Adsorption der Stoffe sind, wie schon berichtet wurde, die Eigenschaften des Adsorbens und des Lösungsmittels entscheidend. Weiterhin ist die chemische Konstitution des jeweiligen Adsorbendum zu berücksichtigen.

Im folgenden sollen daher die wesentlichsten Eigenschaften der Schlafmittelgruppen Erörterung finden und Überlegungen darüber angestellt werden, inwieweit sie sich auf die Adsorp-

tion der Gruppen auswirken werden.

Die therapeutisch wichtigsten Schlafmittel werden auf Grund ihrer Konstitution in zwei Hauptgruppen unterteilt, die Barbitale, die sich vom Ringsystem der Barbitursäure ableiten, und die Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa, die Substanzen verschiedener Stoffklassen (Ureide, Tetrahydropyridin- und Piperidinderivate) enthält.

Die zu untersuchenden Wirkstoffe weisen alle eine saure Eigenschaft auf, die durch ihre -CO-NH-CO- oder -CO-NH-CH=CH-Gruppierung gegeben ist. Auf Grund unterschiedlicher Dissoziation, die wiederum auf die verschiedene Konstitution der Schlafmittel zurückzuführen ist, unterscheiden sich jedoch die Barbitale von den schwach sauren bis neutralen barbitursäurefreien Schlafmitteln.

Innerhalb der beiden erwähnten Gruppen sind die Dissoziationskonstanten nur sehr wenig unterschiedlich. BÜCHI und PERLIA stellten fest, daß bei den Barbitursäurederivaten die Ka-Werte zwischen 0,25 und 2,51 liegen und somit nur um 2,26 differieren. Für die barbitursäurefreien Schlafmittel wurden bis jetzt noch keine Dissoziationskonstanten ermittelt. Es steht jedoch auf Grund der Konstitution und der praktischen Erfahrung fest, daß die barbitursäurefreien Wirkstoffe nur sehr wenig dissoziiert vorliegen.

Diese unterschiedliche Dissoziation der Barbitale und barbitursäurefreien Schlafmittel kann zu einer verschiedenen Löslichkeit ausgenützt werden. So gehen die Barbitale im Gegensatz zu den anderen Sedativa schon bei Zusatz von schwachen Alkali in die dissoziierte Form über, die gut wasserlöslich ist.

Die undissoziierte Form, in der die Wirkstoffe in den Handelspräparaten vorliegen, ist ausgesprochen gut in organischen Lösungsmitteln, wie Äther und Chloroform, löslich. Eine Zusammenstellung der verschiedenen organischen Lösungsmittel in Bezug auf die Löslichkeit der Schlafmittel in ihnen wird in dieser Arbeit im praktischen Teil gegeben.

Eine Lipotropie aller Schlafmittel ist durch die Alkylierung des Ringsystems am C-5 (Barbitale) oder am C-3 (Persedon, Noludar) gegeben (PRIBILLA). Ebenso wird die Lipotropie durch

eine Methylierung am Stickstoffatom (Evipan, Eunarcon, Prominal) erhöht. Auf Grund dieser Substitutionsverschiedenheiten ist daher eine geringe Differenzierung durch die Löslichkeit der einzelnen Stoffe in organischen Lösungsmitteln möglich.

Bei dem Adsorptionsvorgang ist die Löslichkeit der Substanzen in den Solventien mit zu berücksichtigen, da laufend eine Gleichgewichtseinstellung zwischen der adsorbierten Menge und seiner Konzentration in der Lösung erfolgt. Da ein pH-Einfluß der basischen Aluminiumoxyde auf die Schlafmittel zu erwarten ist, ist es daher von Wichtigkeit, ob sich die Schlafmittel in der dissoziierten oder undissoziierten Form auf der Adsorptionssäule befinden und zur Entwicklung gebracht werden. Ebenso könnte ein saurer pH-Wert eines Aluminiumoxyds die Lösung der Schlafmittel in den organischen Lösungsmitteln begünstigen.

Durch diesen Einfluß der verschiedenen Aluminiumoxyde werden sich, wie angeführt wurde, zusätzlich unterschiedliche Löslichkeiten für die Substanzen ergeben, wobei noch unberücksichtigt bleibt, wie fest der jeweilige Stoff an das Adsorbens gebunden wird, was schließlich weiterhin von entscheidender Bedeutung für eine adsorptionschromatographische Trennung ist. Diese Ausnützung der Löslichkeitsunterschiede ist vor allem dann angebracht, wenn die Substanzen nur geringe Unterschiede in der Adsorptionsaffinität und der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufweisen.

Die Adsorptionsaffinität der Schlafmittel mit heterocyclischem Ring wird sich wahrscheinlich in erster Linie auf das Grundgerüst beziehen, da die Substituenten apolare Gruppen darstellen. Letztere können, wie bereits erwähnt, wiederum für eine entsprechende Löslichkeit im organischen Lösungsmittel ausschlaggebend sein. Jedoch werden auch die Substituenten für eine entsprechende Adsorptionsaffinität eines Schlafmittels von Bedeutung sein.

Bei den aliphatischen Ureiden ist auf Grund ihrer Konstitution anzunehmen, daß ihre Adsorptionsaffinität zum Adsorbens durch das Grundgerüst der Kette und vor allem durch die $-CO-NH_2$ Gruppierung, die stark adsorbierbar ist, bedingt wird.

Inwieweit durch die Adsorptionsaffinität der Schlafmittel und ihrer verschiedenen Löslichkeit in den Solventien eine Trennung der beiden Gruppen auf einem Adsorbens möglich ist, bleibt entsprechenden Versuchen vorbehalten.

II. Säulenchromatographische Trennungen mit Aluminiumoxyd

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde Aluminiumoxyd "Woelm" gewählt, da mit diesem aktiven, standardisierten Adsorbens die Adsorptionsaffinitäten der Substanzen durch eine Variation der Lösungsmittel und Aktivitätsherabsetzung des Adsorbens am besten abzustimmen sind.

Zur Untersuchung wurden folgende Schlafmittel herangezogen:

Barbitursäurederivate:

5-Cyclohexenyl-1,5-dimethylbarbitursäure	= Evipan	+)
5,5-Phenyläthyl-1-methylbarbitursäure	= Prominal	
5,5-Cycloheptenyl-äthylbarbitursäure	= Medomin	
5,5-Cyclopentenyl-allylbarbitursäure	= Cyclopal	
5,5-Isopropyl-β-bromallylbarbitursäure	= Noctal	
5,5-Cyclohexenyl-äthylbarbitursäure	= Phanodorm	
5,5-Diallylbarbitursäure	= Dial	
5,5-Phenyläthylbarbitursäure	= Luminal	
5,5-Diäthylbarbitursäure	= Veronal	

Barbitursäurefreie Schlafmittel:

α-Bromisovalerianylcarbamid	= Bromural
α-Bromdiäthyl-acetylcarbamid	= Adalin
α-Phenyl-α-äthyl-glutarsäureimid	= Doriden
2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydropyridin	= Persedon
2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methylpiperidin	= Noludar
1-Äthinyl-cyclohexylcarbamat	= Valamin

+) Im Verlauf der Arbeit werden die verschiedenen Wirkstoffe mit ihren Handelsbezeichnungen wiedergegeben.

Die Auswahl der Wirkstoffe wurde unter Berücksichtigung der Häufigkeit ihres Auftretens bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen vorgenommen.

a.) Versuchsanordnung

Es wurde bei den Untersuchungen nachfolgende Versuchsanordnung gewählt, soweit Abweichungen davon im Laufe der Ausführungen vorkommen, werden diese bei den einzelnen Versuchen erwähnt werden.

α.)Herstellung der Aluminiumoxydsäule

Das Chromatographierohr (Glasrohr mit Hahn, Ø 1,5 cm, Länge 23 cm), welches das für die erste Entwicklung vorgesehene Lösungsmittel enthielt, wurde mit einer bestimmten Menge von entsprechendem Aluminiumoxyd gefüllt. Dieses "feuchte" Einfüllen des Adsorbens in die Säule wurde aus dem Grunde angewandt, da Vorversuche ergaben, daß im Gegensatz zum "trocknen" Einfüllen dadurch gleichmäßigere Säulenfüllungen mit dem Adsorbens erreicht wurden.

Das Adsorbens in der Säule wurde daraufhin mit einer Schicht Watte abgedeckt und das Lösungsmittel bis zum oberen Rand der Füllung abfließen gelassen. Anschließend daran wurde eine entsprechende Menge von Substanzlösung, die mit dem zuerst zur Entwicklung kommenden Lösungsmittel hergestellt wurde, auf die Säule aufgebracht, einlaufen gelassen und das Lösungsmittel aufgegeben.

Im Prinzip wurde die Elutionsanalyse durchgeführt, und die einzelnen Schlafmittel sollten je nach der Stärke ihrer Adsorption im Eluat erscheinen.

Zur Feststellung der Adsorptionsaffinitäten der einzelnen Schlafmittel wurden diese zunächst für sich allein auf der Säule entwickelt. Erst da, wo sich Möglichkeiten zu einer Trennung ergaben, wurden Substanzmischungen auf die Säule aufgebracht.

Die Durchlaufgeschwindigkeit der Lösungsmittel betrug ca. 1 ml/Min.

Die zur Anwendung gelangenden Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und mit Calciumchlorid getrocknet. Äther wurde peroxydfrei hergestellt.

β.) Bestimmung der Substanzen im Eluat

Die durchlaufenden Eluate wurden einzeln in bestimmten Anteilen aufgefangen. Nach dem Abdunsten der Lösungsmittel im Luftstrom wurden die Fraktionen gravimetrisch bestimmt und nach den üblichen Identifizierungsverfahren auf Schlafmittel untersucht.

Die Barbitale wurden in Form der Kobalt- bzw. Kupferkomplexe mit Zwikkers Reagens und das Bromatom der Ureide nach MÜHLEMANN-BÜRGIN mit Silbernitrat als Silberbromid nachgewiesen. Bei schwerer in den einzelnen Fraktionen zu identifizierenden Schlafmitteln wie Noludar, Persedon, Doriden sowie auch da, wo die Empfindlichkeit der Reagenzien nicht mehr ausreichte, wurden die Substanzen mit Hilfe der Papierchromatographie, die noch entsprechende Erwähnung finden wird, identifiziert.

Der qualitative Nachweis erwies sich auch bei der Entwicklung nur eines Wirkstoffes auf der Säule zwecks genauer Auswertung der Ergebnisse als notwendig, um den Anfangs- und Endpunkt der Elution der Substanz genau festlegen zu können. Bei der Chromatographie von Mischungen mehrerer Schlafmittel wurde zur sicheren Identifizierung in den einzelnen Eluaten vor allem der papierchromatographische Nachweis geführt.

b.) Chromatographie an saurem Aluminiumoxyd

Angeregt durch die Erfolge, die nach HESSE bei der Trennung von sauren Substanzen in organischen Lösungsmitteln an einem sauren Adsorbens vorliegen, wurden zur Aufstellung einer chromatographischen Trennung der Schlafmittelgruppen zunächst Untersuchungen mit saurem Aluminiumoxyd "Woelm" vorgenommen.

1. Vorversuche

Um festzustellen, welches Lösungsmittel zur Trennung der zu untersuchenden Gruppen zur Anwendung kommen könnte, wurden Versuche auf 2g-Säulen aus saurem Aluminiumoxyd "Woelm" Akt.St.I mit den verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei wurde das chromatographische Verhalten von Luminal und

Bromural als Vertreter der verschiedenen Gruppen bei der Entwicklung mit Aceton, Äther, Chloroform, Dichlormethan und Benzol untersucht. Die zur Entwicklung gebrachte Substanzmenge betrug je 10 mg.

Bei der Entwicklung von Luminal und Bromural mit Aceton deutete schon ein geringer Unterschied in der Adsorption auf eine festere Bindung von Bromural hin.

Bei der Anwendung von Äther war ein größerer Adsorptionsunterschied von Luminal und Veronal zu Bromural festzustellen, da letzterer Wirkstoff bei Verwendung eines einwandfreien Aluminiumoxyds Akt.St.I mit 50 ml Äther nicht zu eluieren war. Versuche mit Adalin ergaben, daß es schwächer als Bromural adsorbiert wird. Erfolgt jedoch nur eine geringe Aktivitätsherabsetzung des Adsorbens durch Aufnahme von Luftfeuchtigkeit, so werden die Ureide in ihrer Adsorption beeinflußt und zeitiger eluiert.

Als weiteres Lösungsmittel fand Chloroform (1 % Stabilisierungs-Alkohol-Gehalt) zur Entwicklung von Luminal und Bromural Anwendung. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu Äther eine Elution von Bromural. Versuche mit alkoholfreiem Chloroform, hergestellt nach der Vorschrift von WOHLLEBEN (1956), ergaben keine Elution von Luminal und Bromural. Dieses beweist, daß die eluierende Wirkung des Chloroforms auf den Alkoholgehalt zurückzuführen ist.

Weitere Untersuchungen bei Entwicklung mit 50 ml Dichlormethan oder Benzol ergaben keine Elution von Luminal und Bromural.

Die erhaltenen Ergebnisse bei Entwicklung der angeführten Wirkstoffe mit Aceton, Äther und Chloroform sind in Abb. 1 und 2 als Elutionskurven graphisch dargestellt.

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, daß bei Anwendung von saurem Aluminiumoxyd eine deutlich unterschiedliche Adsorption zwischen Luminal einerseits und Bromural, Adalin andererseits vorhanden ist, wobei letztere Wirkstoffe eine größere Adsorption zeigen. Für eine chromatographische Trennung sind als Lösungsmittel vor allem Äther und Chloroform geeignet.

Abb. 1

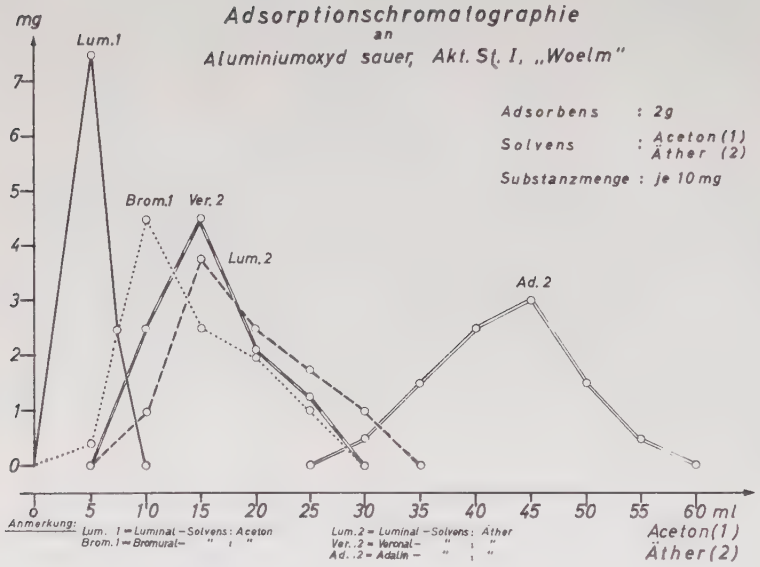
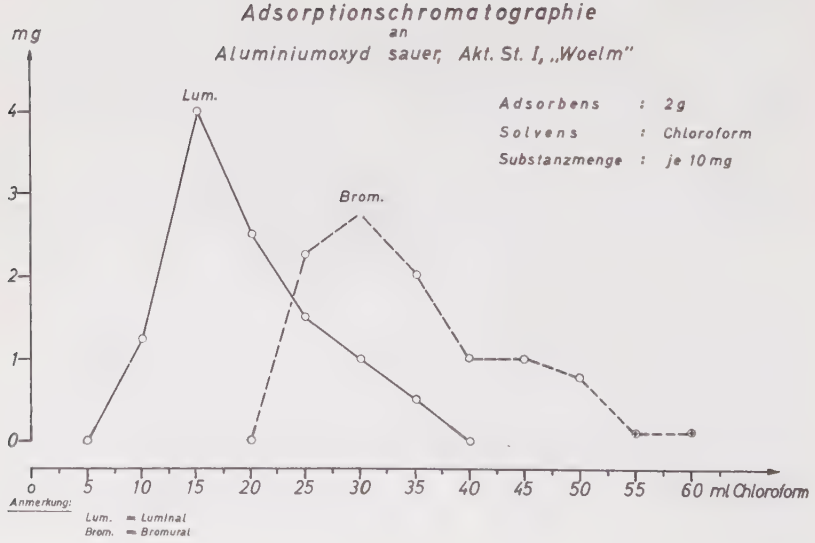

Adsorptionschromatographie
an
Aluminiumoxyd sauer, Akt. St. I, „Woelm"
mg
Lum.1
Brom.1
Ver.2
Lum.2
Ad.2
Adsorbens : 2g
Solvens : Aceton (1)
Äther (2)
Substanzmenge : je 10 mg
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 ml
Aceton(1)
Äther(2)
Anmerkung:
Lum. 1 = Luminal – Solvens: Aceton
Brom. 1 = Bromural – " " "
Lum. 2 = Luminal – Solvens: Äther
Ver. 2 = Veronal – " " "
Ad. 2 = Adalin – " " "

Abb. 2


Adsorptionschromatographie
an
Aluminiumoxyd sauer, Akt. St. I, „Woelm"
mg
Lum.
Brom.
Adsorbens : 2g
Solvens : Chloroform
Substanzmenge : je 10 mg
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 ml Chloroform
Anmerkung:
Lum. = Luminal
Brom. = Bromural

2. Äther als Solvens

α.) Untersuchungen an saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I

Eine Möglichkeit der Trennung der Barbitale von den barbitursäurefreien Wirkstoffen wurde auf Grund der Voruntersuchungen in einer Vergrößerung der Menge des Adsorbens gesehen, um bessere Unterschiede in der Elution zwischen den zu untersuchenden Substanzen zu erreichen.

Die Untersuchungen mit einer 5g-Säule von saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I "Woelm", die mit Äther entwickelt wurde, zeigten jedoch, daß Luminal und Adalin hierbei zu stark adsorbiert wurden und erst nach einem Durchlauf von 80 ml Äther in den einzelnen Eluaten festzustellen waren. Es erschien daher notwendig, durch Aktivitätsherabsetzung des Adsorbens die Adsorption der Wirkstoffe zu verringern.

β.) Anwendung verschiedener Aktivitätsstufen

Entsprechend der Vorschrift von HESSE, DANIEL und WOHLLEBEN wurde das standardisierte Aluminiumoxyd sauer, Akt.St.I, "Woelm" durch genauen Wasserzusatz in die entsprechenden Aktivitätsstufen nach BROCKMANN und SCHODDER und in dazwischenliegende Aktivitäten überführt.

Mit diesen Aktivitäten wurden Säulen zu 5 g bereitet und daran Luminal, Bromural und Adalin mit Äther entwickelt. Die aufgebrachte Menge betrug 10 mg Substanz. Die Eluate wurden zu je 10 ml aufgefangen,und nach Ablaufen von 12 Fraktionen wurde mit 15 ml Äthanol eluiert.

Es zeigte sich, daß die Elution für Luminal bei Akt.St.II zwischen der 2. und 6. Fraktion und bei geringerer Aktivität in der 1. und 2. Fraktion erfolgte. Bromural wurde bis zu einer Aktivitätsstufe III nicht eluiert.

Die gravimetrische Bestimmung ergab jedoch, daß die erhaltenen Ätherfraktionen nicht die gesamte eluierte Substanzmenge enthielten und daß die Restmengen in der Äthanol-Fraktion vorlagen. Die Wirkstoffe wurden zwar in einer Hauptzone entwickelt, doch blieben noch Anteile adsorbiert. Es trat somit eine Schwanzbildung auf.

Die bei den verschiedenen Aktivitäten des Aluminiumoxyds unter den angeführten Bedingungen eluierten Substanzmengen sind in nachfolgender Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab.1
Eluierte Substanzmengen bei Entwicklung mit Äther (120 ml)

Aluminiumoxyd sauer		Luminal	Bromural	Adalin
Akt.St.	Wasser-zusatz			
II	3 %	60 %	-	63 %
III	6 %	73 %	-	100 %
	6,5 %	80 %	15 %	
	7 %	81 %	28 %	
	8 %	85 %	65 %	
IV	10 %	100 %	100 %	

Das Ergebnis der Voruntersuchung mit einer Säule von 2 g saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I, aus der Luminal quantitativ zu eluieren war, steht hierzu im Gegensatz. Eine Erklärung für die Adsorption des Restes von Luminal ergibt sich vermutlich aus folgenden Gründen. Durch die Aktivitätsherabsetzung des Adsorbens mit Wasser könnte ein Aluminiumoxyd mit großer innerer Oberfläche entstanden sein, das Teile des Wirkstoffes an dieser Oberfläche stark adsorbierte, so daß die adsorbierte Substanz infolge der geringeren Einstellgeschwindigkeit mit dem Solvens nicht im Gleichgewicht war. Weiterhin würden die Ergebnisse auch dadurch zu erklären sein, daß auf der ganzen Säule nicht eine ausreichende saure Reaktion gleichmäßig vorhanden war. Da die Barbitale bei höherem pH stärker adsorbiert werden, könnten sich so Teile der Substanzen an das Aluminiumoxyd stärker binden.

Daß die Barbitale eine schwächere Adsorptionsaffinität als die Ureide auf einem sauren Aluminiumoxyd aufweisen, ist vor allem mit auf die bessere Löslichkeit der undissoziierten Barbitale im Äther zurückzuführen. Bei gleichmäßigem Vorliegen eines genügend niedrigen pH auf der Adsorptionssäule müßte es möglich sein, die erwähnten negativen Einwirkungen auf-

zuheben und die Einstellung der Adsorptionsgleichgewichte der Substanzen dahingehend zu beeinflussen, daß die Barbitale quantitativ vor den Ureiden aus der Säule zu eluieren sind.

γ.) Untersuchungen nach Vorbehandlung des Aluminiumoxyds mit Essigsäure

Um die obige Annahme zu beweisen und für eine Trennung auswerten zu können, wurden Schütteltests, die nur als Vorprobe zu werten sind, durchgeführt.

Hierzu wurden 5 g saures Aluminiumoxyd "Woelm" verschiedener Aktivitätsstufen mit 20 ml Äther, die 10 mg Luminal und einen entsprechenden Eisessigzusatz (96 %) enthielten, ca. 10 Minuten geschüttelt und die verbleibende Substanzmenge im Äther gravimetrisch bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengestellt und beweisen, daß die Adsorption des Luminal bei Gegenwart von Eisessig wesentlich abnimmt.

Tab. 2

Substanzmengen im Äther nach dem Schütteln mit Aluminiumoxyd

Aluminiumoxyd sauer		Luminal			
Akt.St.	Wasser-Zusatz	Eisessigzusatz zum Äther 0 %	0,25 %	0,5 %	1 %
I	0 %	0 %	10 %	40 %	60 %
II	3 %	40 %	60 %	70 %	100 %
III	6 %	70 %	80 %	80 %	100 %
	8 %	80 %	80 %	80 %	100 %
IV	10 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Zur Übertragung der Versuchsergebnisse auf die Säule war es notwendig, dem Adsorbens vor dem Entwickeln der Substanzen einen stärker sauren Charakter zu geben.

Es wurde daher eine Mischung von 25 ml Äther mit 1 % Eisessig (96 %) hergestellt und damit das leere Rohr beschickt. Durch "feuchtes" Einfüllen wurde eine Säule von 5 g saurem

Aluminiumoxyd Akt.St.I hergestellt und das überstehende Äther-Eisessig-Gemisch bis zur Oberfläche des Adsorbens abfließen gelassen. Daran anschließend wurden 3 ml Äther aufgebracht und einfließen gelassen. Sodann wurde die zu untersuchende Substanz (10 mg) aufgebracht, mit Äther entwickelt und mit 30 ml Äthanol nacheluiert.

Die Untersuchungen mit Luminal, Veronal, Phanodorm und Medomin ergaben unter den angeführten Bedingungen eine vollständige Elution der Wirkstoffe in 6 Fraktionen zu 10 ml, wobei Adalin und Bromural nicht eluiert wurden.

Bei den weiteren Versuchen mit den Substanzen Valamin, Persedon, Doriden und Evipan zeigte es sich, daß diese Wirkstoffe auch eluiert wurden. Diese Substanzen ergeben kein gutes Elutionsmaximum und zeigen Schwanzbildungen. Die Adsorptionsaffinitäten dieser Wirkstoffe werden durch die höhere Acidität des Adsorbens schwächer beeinflußt, so daß die Einstellgeschwindigkeit des Gleichgewichtes geringer ist als bei den Barbitalen.

Das Bromural und Adalin hier eine Ausnahme zeigen, findet in der starken Adsorption, die den Stoffen auf Grund der Konstitution gegeben ist, seine Erklärung.

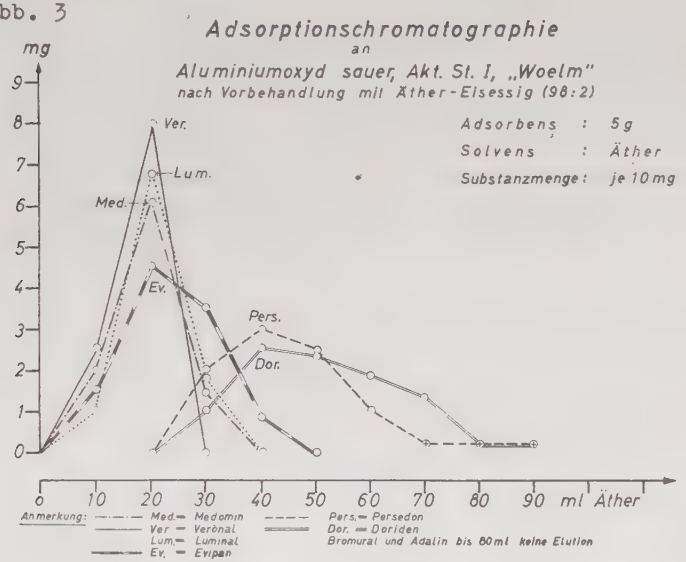
Da bei einem geringeren Säurezusatz zum Äther ebenso Persedon in den Eluaten festzustellen waren,und die Barbitale unter diesen Verhältnissen in breiteren Zonen entwickelt wurden, kam nur eine solche Erhöhung des Eisessiganteiles im Äther in Betracht, daß dabei gerade noch Adalin und Bromural adsorbiert blieben.

Am geeignetsten erwies sich hierzu die Vorbehandlung von 5 g saurem Aluminiumoxyd der Akt.St.I mit 25 ml einer Mischung von Äther und 2 % Eisessig (96 %).

Die Abb. 3 zeigt die Elutionskurven der Wirkstoffe von Veronal, Luminal, Medomin und Evipan, die bei der Entwicklung mit Äther mit ausgeprägten Elutionsmaxima eluiert wurden. Phanodorm, Noctal und Prominal wurden in gleicher Weise eluiert. Doriden und Persedon ergaben abgeflachte Elutionskurven und waren im gesamten Ätherdurchlauf (90 ml) zu ca. 80-90 % festzustellen. Auch Valamin und Noludar wurden mit den einzelnen Fraktionen eluiert und gaben ebenfalls stark

abgeflachte Elutionskurven. Die Ureide wurden bis zu einem Ätherdurchlauf von 80 ml nicht eluiert. Bromural wird etwas fester als Adalin adsorbiert.

Abb. 3



Anschließende Versuche mit Substanzmischungen, vor allem der Substanzen Evipan und Bromural zu je 10-30 mg, bewiesen ebenfalls, daß sich diese Wirkstoffe unter den angeführten Bedingungen quantitativ trennen lassen.

Bei den Untersuchungen gelang somit bei Anwendung eines mit Äther-Eisessig (98:2) vorbehandelten sauren Aluminiumoxyds "Woelm" durch Entwicklung mit Äther eine quantitative Trennung der Barbitale von den Ureiden (Bromural und Adalin). Ebenso ist eine halbquantitative Trennung der Substanzen Doriden, Persedon, Valamin und Noludar von Adalin und Bromural möglich.

3. Chloroform als Solvens

α.) Untersuchungen an saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I.

Die Voruntersuchungen (Abb.2) mit 2 g saurem Aluminiumoxyd hatten gezeigt, daß die Entwicklung von Luminal und Bromural mit Chloroform durch den Stabilisierungsalkohol ermöglicht

wird. Es wurde daher angenommen, daß bei der Entwicklung von Luminal mit Chloroform an einer 5 g sauren Aluminiumoxydsäule Akt.St.I - im Gegensatz zu Äther - eine weitgehendere und fraktionsmäßig zeitigere Elution des Wirkstoffes ohne Aktivitätsherabsetzung erreicht werden könnte.

Die Versuche ergaben, daß 20 mg Luminal (s.Abb. 4) mit 45 ml Chloroform mit einem abgeflachten Elutionsmaximum wohl zu eluieren waren, daß jedoch eine ausgeprägte Schwanzbildung eintrat. Letzteres war vor allem deshalb ungünstig, weil mit einer unmittelbar nachfolgenden Entwicklung des Bromural und vor allem des Adalin, die ebenfalls durch den Alkoholgehalt im Chloroform an Adsorptionsaffinität verlieren, zu rechnen war.

Der Parallelversuch mit 20 mg Bromural zeigte, daß dieser Wirkstoff mit 60 ml Chloroform nicht eluiert wurde. Da hierbei ein Adsorptionsunterschied und halbquantitative Trennung von Luminal und Bromural zu erkennen war, schien eine Möglichkeit zur besseren Ausbildung des Elutionsmaximums für Luminal durch Variation des Alkoholgehaltes im Chloroform gegeben.

β.) Untersuchungen mit Alkoholzusatz zum Lösungsmittel

Bei der Entwicklung von Luminal an 5 g saurem Aluminiumoxyd mit 2 % Äthanol enthaltendem Chloroform wurden 85 % des Wirkstoffes in den ersten Fraktionen eluiert. Erst bei Anwendung des Laufmittels Chloroform: Äthanol = 95:5 konnte ein hohes Elutionsmaximum bei quantitativer Elution von 20 mg Luminal, das in Abb. 4 dargestellt ist, erreicht werden.

Bei der Anwendung dieser Bedingungen auf die Entwicklung von 20 mg Bromural ergab sich jedoch, wie aus Abb.4 ersichtlich ist, daß die Adsorption von Bromural durch das Laufmittel so stark beeinflußt wurde, daß keine genügende Trennschärfe gegenüber Luminal vorhanden war.

Da die anderen barbitursäurefreien Substanzen im Gegensatz zum Bromural noch eine geringere Affinität zum Adsorbens aufweisen, wurde auf das Laufmittel Chloroform mit 2 % Äthanol zurückgegriffen und Versuche mit 20 mg Adalin geführt. Es zeigte sich, daß Adalin schon bei diesem Alkoholzusatz quanti-

tativ mit den ersten Fraktionen eluiert wurde. Bei gemeinsamer Entwicklung von Luminal und Adalin würden daher unter diesen Bedingungen beide Wirkstoffe zusammen in einer Zone eluiert werden.

Durch einen entsprechenden Alkoholzusatz zum Chloroform konnte somit keine Abtrennung der Barbitale von den barbitursäurefreien Substanzen erreicht werden. Dieses Verhalten kann dadurch erklärt werden, daß die Einstellgeschwindigkeit des Adsorptionsgleichgewichtes von Luminal bei der Entwicklung mit Chloroform an einem sauren Aluminiumoxyd nicht vollständig ist und nur unter Anwendung eines Laufmittels mit verhältnismäßig hohem Alkoholgehalt gegeben ist. Der höhere Alkoholgehalt hat jedoch zur Folge, daß die Adsorption der barbitursäurefreien Substanzen so stark verringert wird, daß dann kein ausreichender Adsorptionsunterschied zu den Barbitalen besteht.

γ.) Anwendung verschiedener Aktivitätsstufen

Weitere Untersuchungen wurden mit 5 g saurem Aluminiumoxyd verschiedener Aktivitätsstufen durchgeführt, um hierbei die Adsorptionsaffinitäten von 10 mg Luminal und 10 mg Bromural bei der Entwicklung mit Chloroform festzustellen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind als Elutionskurven in Abb. 5 graphisch dargestellt.

Dabei ist vor allem im Gegensatz zur Entwicklung mit Äther unter den entsprechenden Verhältnissen (vgl. Tab.1) festzustellen, daß schon mit 55 ml Chloroform beide Wirkstoffe von einem Aluminiumoxyd Akt.St.II quantitativ zu eluieren waren. Die Entwicklung von Bromural und Luminal fällt daher zusammen. Dieses abweichende Verhalten gegenüber der Entwicklung mit Äther, bei der Bromural von einem Aluminiumoxyd Akt.St.II nicht eluiert wurde, ist auf den Alkoholgehalt des Chloroforms zurückzuführen.

Die Elutionskurven von Bromural und Luminal zeigten bei der Entwicklung mit Chloroform an einem Aluminiumoxyd Akt.St.II noch stark abgeflachten Verlauf. Erst bei den Akt.St.III und IV wurden die beiden Wirkstoffe mit guten Elutionsmaxima gewonnen.

Abb. 4

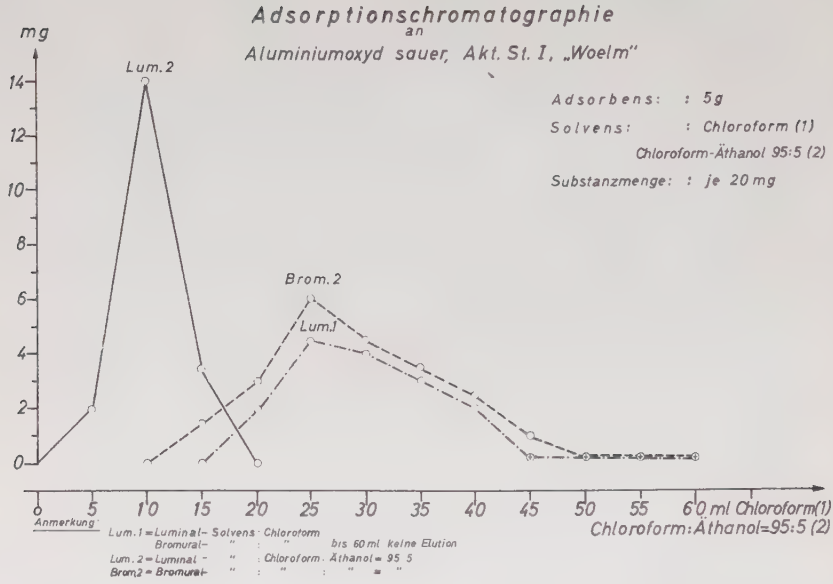
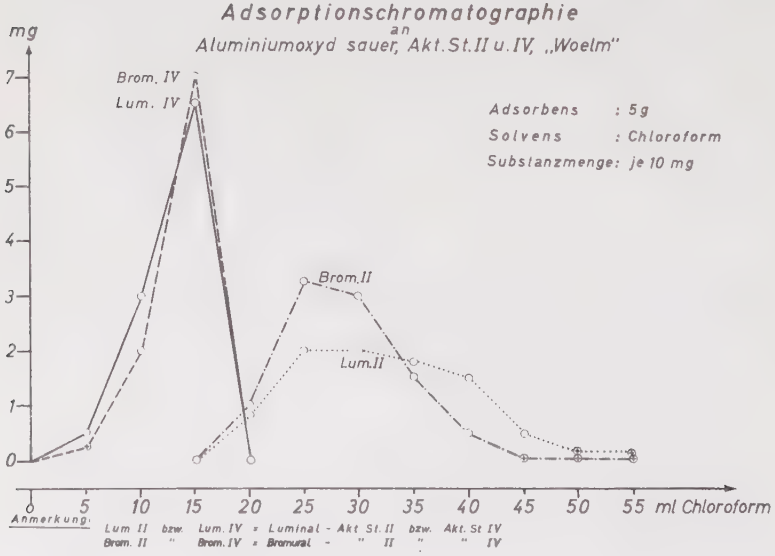

Adsorptionschromatographie
an
Aluminiumoxyd sauer, Akt. St. I, „Woelm"
mg
Lum.2
Brom.2
Lum.1
Adsorbens: : 5g
Solvens: : Chloroform (1)
Chloroform-Äthanol 95:5 (2)
Substanzmenge: : je 20 mg
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 ml Chloroform(1)
Chloroform:Äthanol=95:5 (2)
Anmerkung:
Lum.1 = Luminal- Solvens: Chloroform
Bromural- " : " bis 60 ml keine Elution
Lum.2 = Luminal - " : Chloroform-Äthanol = 95 5
Brom.2 = Bromural- " : " : " = "

Abb. 5


Adsorptionschromatographie
an
Aluminiumoxyd sauer, Akt.St.II u.IV, „Woelm"
mg
Brom. IV
Lum. IV
Brom.II
Lum.II
Adsorbens : 5g
Solvens : Chloroform
Substanzmenge: je 10 mg
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 ml Chloroform
Anmerkung:
Lum II bzw. Lum. IV = Luminal - Akt St. II bzw. Akt. St IV
Brom. II " Brom. IV = Bromural - " II " " IV

Da sie aber nach diesen Versuchen mit Aktivitätsherabsetzung des Aluminiumoxyds zusammen entwickelt werden, und die anderen zu untersuchenden Substanzen ein ähnliches Verhalten zeigen würden, erschien unter diesen Verhältnissen eine Gruppentrennung nicht möglich. Die Resultate der Versuchsreihe sind aber nutzbringend für die Entwicklung der Substanzen mit Chloroform an einer basischen Säule.

c. Chromatographie an basischem Aluminiumoxyd

Wie bei der Chromatographie der Barbitale an saurem Aluminiumoxyd "Woelm" festgestellt wurde, zeigte sich ein Einfluß des pH des Adsorbens auf die Adsorption der Barbitale. Aus dieser Tatsache ergab sich die Überlegung, daß auch bei Anwendung eines basischen Aluminiumoxyds ein pH-Einfluß vorhanden sein müßte und für eine Gruppentrennung der Schlafmittel Verwendung finden könnte.

Bei der Entwicklung der Barbitale an basischem Aluminiumoxyd ist zu erwarten, daß diese Wirkstoffe auf Grund ihrer Konstitution in die dissoziierte Form übergehen. Da diese nur eine geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufweist, müßte eine festere Adsorption der Barbitale gegenüber den barbitursäurefreien Substanzen im Hinblick auf deren geringeren Dissoziationsgrad eintreten. Auch ein Kationenaustausch an dem basischen Aluminiumoxyd zur Salzbildung der Barbitale wäre mit zu berücksichtigen.

Nach diesen Überlegungen ergab sich die Frage, inwieweit die Adsorptionsaffinitäten der barbitursäurefreien Substanzen eine Abtrennung von den Barbitalen ermöglichen. Bei der Annahme, daß bei der Entwicklung der barbitursäurefreien Wirkstoffe - vor allem der Ureide - an einem basischen Aluminiumoxyd kein pH-Einfluß auf diese Substanzen gegeben ist, müssen deren Adsorptionsverhältnisse, die bei der Entwicklung an einem sauren Aluminiumoxyd ermittelt wurden, zu übertragen sein. Dabei würde vor allem die große Adsorptionsaffinität von Bromural entsprechend den angewandten Bedingungen in Betracht zu ziehen sein.

Durch anschließende Versuche galt es daher zu ermitteln, ob durch verschiedene Lösungsmittel und Aktivitätsveränderun-

gen Möglichkeiten geschaffen werden könnten, um bei erniedrigter Adsorptionsaffinität der barbitursäurefreien Schlafmittel eine Elution der Barbitale zu verhindern.

1. Vorversuche

Es wurden zuerst Modellversuche mit 2 g basischem Aluminiumoxyd Akt.St.I "Woelm" durchgeführt, um das adsorptive Verhalten von 10 mg Bromural und 10 mg Luminal bei der Entwicklung mit Aceton, Äther, Chloroform, Dichlormethan und Benzol zu untersuchen.

Aus den Ergebnissen, die mit den Elutionskurven von saurem Aluminiumoxyd (Abb. 1 und 2) verglichen wurden, konnte festgestellt werden, daß Bromural keine wesentlich veränderte Adsorption an diesem basischen Adsorbens aufweist. Bei der Entwicklung von Luminal fand im Gegensatz zum sauren Aluminiumoxyd bei der Entwicklung mit 50 ml der angeführten Lösungsmittel an basischem Aluminiumoxyd keine Elution des Wirkstoffes statt.

Diese Untersuchungen bestätigen die vorangegangenen theoretischen Überlegungen, wonach die Barbitale an einer basischen Säule fester als die barbitursäurefreien Substanzen adsorbiert werden und daß sich die Adsorption von Bromural an einer basischen Säule nicht von der an saurem Aluminiumoxyd unterscheidet.

Für die Trennung der Barbitale von den anderen Sedativa erwies sich eine Entwicklung der Substanzen mit Äther oder Chloroform als günstig.

2. Äther als Solvens

α.) Untersuchungen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.I

Die Entwicklung von je 10 mg Adalin, Bromural, Persedon und Valamin mit Äther an einer 5 g basischen Aluminiumoxyd-Säule Akt.St.I bestätigten erneut die starke Adsorption dieser Wirkstoffe, da sie mit 100 ml Äther nicht eluiert wurden.

Besonders soll hierbei das chromatographische Verhalten von Persedon an einem alkalischen Adsorbens erwähnt werden. Nach KUBLI und SCHMID ergibt das Persedon schon in Spuren

in alkalischer Lösung im UV-Licht eine hellblaue Fluoreszenz, die oft zur Identifizierung von Persedon angewandt wird. Auch an einem basischen Aluminiumoxyd tritt diese Eigenschaft hervor, so daß sich schon kleinste Mengen durch eine hellblaue Zone am Adsorbens identifizieren lassen, wenn die Säule unter UV-Licht betrachtet wird. Bei den anderen zu untersuchenden Wirkstoffen wurde im UV keine sichtbare Zonenbildung festgestellt.

β.) Verwendung verschiedener Aktivitätsstufen

Wie bei den vorhergehenden Untersuchungen festgestellt wurde, entsprach die Adsorption der Ureide bei der Entwicklung mit Äther den unter denselben Bedingungen erhaltenen Ergebnissen an saurem Aluminiumoxyd. Es war daher anzunehmen, daß sich bei einer Aktivitätsherabsetzung des basischen Adsorbens ein entsprechendes Verhalten für Bromural und Adalin, wie sie in Tab. 1 angeführt sind, ergeben würde. Dieses würde bedeuten, daß eine Aktivitätsstufe IV notwendig ist, um das Bromural quantitativ mit Äther zu eluieren. Ob unter dieser Bedingung noch eine ausreichende Adsorption der Barbitale vorhanden ist, mußte durch Versuche ermittelt werden.

Zur Beweisführung dieser Überlegung wurden die Ureide sowie auch Persedon, das sich durch seine sichtbare Zonenbildung gut bestimmen ließ, in die nachfolgenden Versuche mit einbezogen.

Für die Untersuchungen wurden wieder verschiedene Aktivitäten des basischen Aluminiumoxyds "Woelm" durch Zugabe einer entsprechenden Wassermenge zum Adsorbens der Akt.St.I hergestellt und davon Säulen mit 5 g bereitet. Die Wirkstoffe wurden in Mengen zu 10 mg aufgebracht, und in Einzelversuchen die Adsorption der Substanzen bei Abnahme von 12 Fraktionen zu 10 ml Äther untersucht. Anschließend daran wurde mit 20 ml Äthanol eluiert.

Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Elutionskurven ergaben, daß die Hauptmenge der Wirkstoffe in den Anfangsfraktionen erhalten wird. Es folgte dann, entsprechend der Aktivität des Adsorbens eine Schwanzbildung oder festere Adsorption des Substanzrestes. Um ein hohes Elutionsmaximum bzw.

eine eng begrenzte Zone zu erzielen, ist es daher notwendig entsprechend niedrigere Aktivitäten des Aluminiumoxyds zu verwenden.

Die bei den verschiedenen Aktivitäten des basischen Aluminiumoxyds bei einer Entwicklung mit Äther eluierten Substanzmengen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tab. 3
Eluierte Substanzmengen bei der Entwicklung mit Äther (120 ml)

Aluminiumoxyd basisch		Luminal	Evipan	Adalin	Bromural	Persedon
Akt.St.	Wasser-Zusatz					
II	3 %	-	-	70 %	-	64 %
III	6 %	-	-	100 %	-	80 %
	8 %	-	40 %		55 %	
IV	10 %	72 %	100 %		97 %	

Aus der Tab. 3 ist zu ersehen, daß Luminal, Evipan und vor allem Bromural trotz Aktivitätsherabsetzung noch stark adsorbiert werden. Medomin, Noctal, Phanodorm und Veronal wurden in gleicher Weise an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III entwickelt. Dabei erfolgte mit Äther ebenfalls keine Elution der Wirkstoffe. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Barbitale infolge der Alkalität des Aluminiumoxyds in die dissoziierte Form übergehen, oder daß zumindest die Bindungen der Wasserstoffatome an den Stickstoffatomen gelockert werden.

Die Untersuchungen (Tab. 3) lassen erkennen, daß es unter diesen Bedingungen nicht möglich ist Bromural von den Barbitalen zu trennen, da dieser Wirkstoff nur unter Anwendung einer Aktivitätsstufe IV quantitativ zu eluieren war, wobei die Barbitale dann nicht mehr genügend adsorbiert werden.

Eine Abtrennung des Adalin von allen Barbitalen war demgegenüber an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III möglich. Die Abb. 6 zeigt, daß die Barbitale mit Äther hierbei noch nicht eluiert werden, während Adalin und Doriden ebenso Valamin schon quantitativ mit den ersten Fraktionen (30 ml) zu eluieren sind. Eine Elution der Barbitale erfolgt erst durch eine

verhältnismäßig große Menge (50 ml) Äthanol. Persedon und Noludar zeigten bei Akt.St.III noch eine geringe Restadsorption.

Wie aus den Tab. 1 und 3 hervorgeht, müßte Adalin von Bromural mit basischem oder saurem Aluminiumoxyd der Akt.St.III bei Entwicklung mit Äther zu trennen sein.

Die entsprechenden Versuche an einem basischen Aluminiumoxyd Akt.St.III, bei denen die Wirkstoffe zu je 10 mg aufgebracht wurden, zeigten, daß bei einer Entwicklung mit Äther Adalin mit den ersten Fraktionen quantitativ eluiert wurde und Bromural in dem nachfolgenden Ätherdurchlauf (60 ml) nicht anfiel, so daß es anschließend mit 30-40 ml Äthanol aus der Säule eluiert werden konnte.

Die Trennung des Adalin von Bromural kann somit an einem basischen Aluminiumoxyd Akt.St.III und vermutlich auch an einem sauren Aluminiumoxyd Akt.St.III, dessen Verhältnisse jedoch nicht untersucht wurden, erreicht werden. Dabei ist aber die genaue Einstellung der angegebenen Aktivität und der Ausschluß von Luftfeuchtigkeit notwendig, da die Untersuchungen ergeben haben, daß bei verhältnismäßig geringer Herabsetzung der Aktivität unter die Stufe III bereits Bromuralspuren in der Adalinfraktion zu finden waren. Der größte Teil des Bromurals blieb jedoch noch stark adsorbiert. Die quantitative Trennung dieser beiden Wirkstoffe ist daher mit einer sehr genauen Einstellung der Aktivität des Adsorbens verbunden und kann bei der praktischen Anwendung nur als halbquantitative Trennung gewertet werden.

γ.) Untersuchungen mit stärker polarem Lösungsmittel

Da Bromural von den Barbitalen auf einem basischen Aluminiumoxyd auf Grund seiner starken Adsorption bei einer Entwicklung mit Äther nicht abgetrennt werden konnte, wurde eine Möglichkeit zur Abtrennung in der Anwendung eines Lösungsmittels mit höherer Polarität gesehen. Durch Alkohol-Zusatz zum Äther sollte untersucht werden, inwieweit sich die Adsorption von Bromural herabsetzen läßt, bevor die Barbitale aus der Säule eluiert werden.

Die Untersuchungen wurden an 5g-Säulen mit einem basischen Aluminiumoxyd Akt.St.III durchgeführt. Bei Anwendung eines Ge-

misches von Äther:Äthanol=97:3 wurde Bromural quantitativ eluiert.

Entsprechende Parallelversuche einzelner Barbitale zu je 10 mg mit diesem Laufmittel ergaben, daß Luminal, Veronal, Phanodorm, Noctal und Medomin bis zu einem Lösungsmitteldurchlauf von 50 ml fest adsorbiert blieben. Evipan und Prominal konnten nur in geringsten Spuren in den ersten Fraktionen festgestellt werden. Eine Elution der Barbitale war durch nachfolgende Anwendung von 50 ml Äthanol möglich.

Wie Bromural wurden auch alle anderen barbitursäurefreien Schlafmittel quantitativ mit den ersten Fraktionen eluiert. In Abb. 7 sind die Elutionskurven von Bromural und Persedon unter diesen Bedingungen graphisch dargestellt.

Eine chromatographische Trennung aller zu untersuchenden barbitursäurefreien Wirkstoffe von den Barbitalen ist somit an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III durch Entwicklung mit Äther:Äthanol=97:3 gegeben.

3. Chloroform als Solvens

Da Bromural besser mit Chloroform (1 % Alkohol) als mit Äther unter gleichen Bedingungen zu eluieren war, wurde zurückgreifend für die Säule mit 5 g basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III anstelle des Solvens Äther-Alkohol Chloroform verwandt.

Hierbei wurden ebenfalls alle zu untersuchenden barbitursäurefreien Schlafmittel (je 10 mg) in den ersten Fraktionen (10-30 ml) eluiert.

Die Barbitale, außer Evipan und Prominal, wurden unter den gleichen Bedingungen mit 50 ml Chloroform nicht eluiert und waren erst in späteren Fraktionen in Spuren nachweisbar.

Es ist somit ein sicherer Fraktionsabstand von 20-30 ml zwischen den Barbitalen und den anderen Sedativa vorhanden. Bei Luminal und Dial vergrößert sich dieser Fraktionsabstand, da diese Wirkstoffe am stärksten adsorbiert werden. Die Elution der Barbitale wurde dann wieder mit 50 ml Äthanol erreicht.

Die Abb. 8 zeigt hierzu einige Elutionskurven der barbitur-

Abb.6

Abb. 7

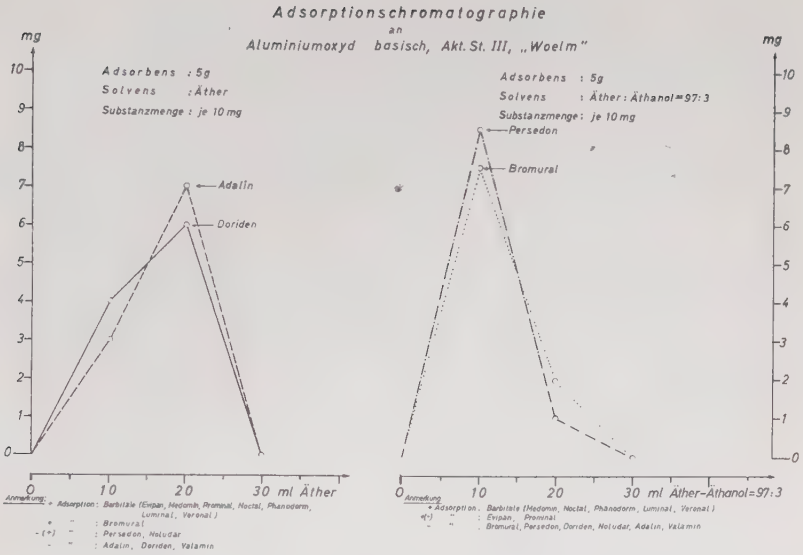
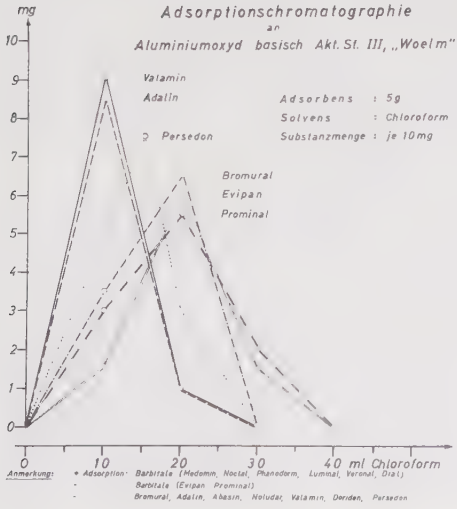


Abb. 8



säurefreien Wirkstoffe, weiterhin von Evipan und Prominal bei der Entwicklung mit Chloroform an einem basischen Aluminiumoxyd Akt.St.III.

Evipan und Prominal blieben bei dieser Entwicklung mit Chloroform - im Gegensatz zu den anderen Barbitalen - nicht adsorbiert, sondern verhielten sich wie die barbitursäurefreien Schlafmittel. Dieser Unterschied zur Entwicklung mit Äther (bzw. Äther-Äthanol) ist darauf zurückzuführen, daß Evipan und Prominal in Chloroform besser als in Äther löslich sind und dementsprechend eine geringere Adsorption aufweisen.

Eine Trennung von Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen ist somit auf einem basischen Aluminiumoxyd Akt.St.III bei Entwicklung mit Chloroform möglich. Alle barbitursäurefreien Schlafmittel lassen sich unter denselben Bedingungen von den Barbitalen (außer Evipan und Prominal)abtrennen.

Die chromatographischen Trennungen sind unter den angegebenen Verhältnissen allerdings nur möglich, wenn die Barbitale in Mengen bis zu 10 mg vorliegen, da ein höherer Barbitalgehalt eine zeitigere Elution bedingen. Luminal, Dial und Veronal, die stärker adsorbiert werden, können bis zu einer Menge von 30 mg entwickelt werden.

Bei größeren Barbitalmengen ist es notwendig die Menge des Adsorbens zu vergrößern. Die Untersuchungen ergaben, daß 100 mg Luminal bei der Entwicklung an 10 g basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III mit 80 ml Chloroform nicht eluiert wurden. Bromural (20 mg) wurden unter diesen Verhältnissen bis zur 4. Fraktion (40 ml) eluiert. Bei dieser größeren Säule blieben Noctal, Phanodorm und Medomin in Mengen zu 30 mg bis 50 ml Chloroformdurchlauf adsorbiert.

Die Trennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen mit Chloroform verläuft im Vergleich zur Entwicklung mit Äther-Alkohol deshalb günstiger, weil das Laufmittel eine geringere Polarität besitzt, wodurch die Barbitale bei der beginnenden Entwicklung besser adsorbiert werden.

In der Tabelle 4 ist die Adsorption der zu untersuchenden Schlafmittel bei den ermittelten Bedingungen an Aluminium-

oxyd übersichtsmäßig zusammengefaßt.

Tab. 4

Adsorption der Schlafmittel an Aluminiumoxyd-Säulen

Adsorbens	Solvens	Substanzmenge	Bromural	Adalin	Valamin	Doriden	Persedon	Noludar	Evipan	Prominal	Medomin	Noctal	Phanodorm	Luminal	Veronal
1. 5g Aluminiumoxyd sauer Akt. St. I, „Woelm" (vorbehandelt mit Äther-Eisessig 98 2)	Äther 80ml	10mg	+	+	+(-)	+(-)	+(-)	+(-)	-	-	-	-	-	-	-
2. 5g Aluminiumoxyd basisch Akt. St. III „Woelm"	Äther 50ml	10mg	+	-	-	-	-(+)	-(+)	+	+	+	+	+	+	+
3. 5g Aluminiumoxyd basisch Akt. St III „Woelm"	Äther Äthanol 97 3 50ml	10mg	-	-	-	-	-	-	+(-)	+(-)	+	+	+	+	+
4. 5g Aluminiumoxyd basisch Akt St III „Woelm"	Chloroform 50ml	10mg	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Anmerkung + positive Adsorption
- negative

d.) Betrachtungen zu den neu ermittelten adsorptionschromatographischen Trennverfahren und zur Chromatographie an Aluminiumoxyd

Nachfolgend soll dargelegt werden, wie die Adsorptionsverhältnisse an einem sauren und basischen Aluminiumoxyd zu bewerten sind und welche weiteren Trennungsmöglichkeiten daraus aufgezeigt werden. Weiterhin soll beurteilt werden, inwieweit die neu ermittelten Trennungen für die forensische Praxis anwendbar sind und welche Folgerungen sich bei dem Ablauf der Trennungen an Aluminiumoxyd ergaben.

Die neu ermittelten Bedingungen zur Trennung von Schlafmittelgruppen oder zur Abtrennung verschiedener Schlafmittelkomponenten unter Anwendung der Adsorptionschromatographie sollen hierbei zusammenfassend mit angeführt werden.

Zusammenstellung der neu ermittelten Trennungen

1. Abtrennung der Barbitale von den Ureiden (Bromural, Adalin) und eine halbquantitative Abtrennung von Doriden, Valamin, Noludar und Persedon an einem sauren Aluminiumoxyd

Akt.St.I "Woelm", das mit Äther-Eisessig vorbehandelt wird, durch Entwicklung mit Äther.

2. Abtrennung von Adalin, Doriden und Valamin von allen Barbitalen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III durch Entwicklung mit Äther.

3. Trennung des Adalin von Bromural an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit Äther.

4. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit einem Äther-Äthanol-Gemisch.

5. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen (außer Evipan und Prominal) an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit Chloroform.

6. Abtrennung von Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit Chloroform.

Die erzielten Resultate lassen vermuten, daß noch weitere Trennungen von Schlafmittelgemischen mit der Adsorptionschromatographie erarbeitet werden könnten. An neutralem Aluminiumoxyd werden nur schwer alle Wirkstoffe in Gruppen aufzutrennen sein. An saurem Aluminiumoxyd ist eine Elution der Barbitale nur mit verhältnismäßig polaren Lösungsmitteln gegeben, die jedoch dabei die Adsorption der barbitursäurefreien Schlafmittel zu stark herabsetzen.

Weitere Trennungsmöglichkeiten der Gruppen können hierbei somit nur an geringer aktiven basischen Adsorbentien bei Entwicklung mit apolaren Solventien wie Dichloräthan oder Toluol vermutet werden, da Löslichkeitsversuche zeigten, daß in diesen Lösungsmitteln die barbitursäurefreien Stoffe etwas besser als die Barbitale löslich sind. Bei zusätzlicher Adsorptionswirkung des basischen Aluminiumoxyds könnte es möglich sein, daß ein genügender Adsorptions-Unterschied der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa zu den Barbitalen auftreten könnte. Voraussetzung wäre jedoch hierzu die Anwendung eines schwach aktiven Aluminiumoxyds - wahrscheinlich Aktivi-

tätsstufe IV-V -, damit die barbitursäurefreien Verbindungen (vor allem Bromural) nicht zu stark adsorbiert werden und in die Eluate übergehen.

Inwieweit unter diesen Bedingungen noch ein genügendes Elutionsmaximum und ein sicherer Fraktionsabstand der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen möglich wäre, könnte nur durch Versuche ermittelt werden. Aus den später angeführten Gründen erschien es jedoch sicherer, die Adsorption der barbitursäurefreien Substanzen völlig auszuschalten und die vorhergehenden theoretischen Erwägungen mit Hilfe der Verteilungschromatographie auszuwerten.

Trotz der guten Anwendungsmöglichkeit der Adsorptionschromatographie zur Trennung von Schlafmittelgruppen muß hierbei auf gewisse Nachteile, die sich bei den durchgeführten Untersuchungen ergaben, hingewiesen werden.

Die Wirkstoffe zeigten bei der Adsorption eine starke Abhängigkeit von der Aktivität des Adsorbens. Um Schwankungen in den Ergebnissen auszuschließen und die Trennungen sicher reproduzieren zu können, ist eine genau bestimmte Aktivität des Adsorbens notwendig.

Das Erreichen der richtigen Aktivität des Adsorbens auf dem Wege der Aktivitätsherabsetzung ist abhängig von der Qualität des jeweiligen standardisierten Ausgangsadsorbens (bzw. Markenprodukt), das gegen Einflüsse der Luftfeuchtigkeit äußerst empfindlich ist. VIDIC (1958) konnte aufzeigen, wie wichtig es ist, ein frisches Aluminiumoxyd mit genauer Aktivität zu verwenden, da sich bei geringster Aktivitätsänderung besonders in den Bereichen hoher Aktivität schon ganz unterschiedliche adsorptive Verhältnisse für die Substanzen ergeben können. Ebenso können Temperatureinflüsse die Adsorptionsisotherme wesentlich beeinflussen.

Trotzdem das Aluminiumoxyd "Woelm" ein standardisiertes Adsorbens für die Praxis darstellt und sich damit die verschiedenen Aktivitätsstufen leicht herstellen lassen, sind aus diesen Gründen Testversuche unerläßlich.

Das Verfahren zur Aktivitätseinstellung von BROCKMANN und SCHODDER gestattet wohl eine Bestimmung der Aktivitätsgrade,

doch ist die Abgrenzung nur annähernd gegeben, da auch bei Präparaten gleicher Aktivität die Ausbildung der Farbzonen etwas unterschiedlich ausfallen kann. Dieses Verfahren ermöglicht vor allem nicht die zahlenmäßige Erfassung der Aktivität. MÜLLER bestimmt durch Kalorimetrierung die Wärmetönung und gibt so ein Maß für die Aktivität eines Adsorptionsmittels an. Dieses Verfahren wird aber nur schwer in der Praxis Anwendung finden können.

Eine Möglichkeit zur Aktivitätsfestlegung des Adsorbens wurde in einer laufenden Bestimmung der Azobenzol-Zahl gesehen. Nach Angaben von HESSE, DANIEL und WOHLLEBEN kann der Verlust an Azobenzol bei der Adsorption an verschiedenen Aktivitätsstufen des Aluminiumoxyds spektrophotometrisch gemessen und daraus die adsorbierte Menge an Azobenzol berechnet werden. Die Untersuchungen zeigten daraufhin, daß wohl eine Reihe mit abnehmender Azobenzol-Adsorption aufgestellt werden kann, daß aber geringe Schwankungen auftreten. Ein bestimmtes Festlegen auf genaue Azobenzolzahlen zur Kennzeichnung der Aktivität erschien somit für die Praxis nicht angebracht. Ein weiterer Nachteil dieser Methode muß darin gesehen werden, daß man die Adsorption auf einen ganz bestimmten Testfarbstoff, der in seiner Reinheit unterschiedlich sein kann, bezieht und daher durch die sehr empfindliche spektrophotometrische Messung zu verschiedenen Werturteilen gelangen könnte.

Infolge der hygroskopischen Eigenschaft des Aluminiumoxyds - aller Aktivitätsstufen - besteht immer die Möglichkeit einer weiteren Aktivitätsherabsetzung durch Aufnahme von Luftfeuchtigkeit, so daß eine gute Reproduzierbarkeit nicht immer gegeben ist. Dies bedeutet, daß die Aktivität des zur Verwendung kommenden Aluminiumoxyds vorher genau festgestellt werden muß. Als absolut sichere Methode kann hierzu nur ein Modellversuch mit den zur Untersuchung kommenden Substanzen angesehen werden.

Da bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen meist Hinweise auf die in Frage kommenden Substanzen fehlen, müssen vorher mit Papier- oder Dünnschichtchromatographie die Wirkstoffe oder ihre Gruppenzugehörigkeit identifiziert werden.

Danach ist ein chromatographischer Modellversuch mit den Wirkstoffen unter den entsprechenden Trennungsbedingungen durchzuführen. Ergeben sich dabei Verhältnisse, wie sie bei den aufgestellten Trennungen dargelegt sind, so können die isolierten Substanzen mit Sicherheit mit dem eingestellten Adsorbens getrennt werden.

Bei den erarbeiteten Trennungen wurde ein genügender Fraktionsabstand zwischen den Schlafmittelgruppen berücksichtigt, so daß bei geringen Aktivitätsschwankungen immer noch eine gute Trennung ermöglicht wird. Die toxikologischen Untersuchungen verlangen jedoch völlige Sicherheit, die immer eine parallele Durchführung von Modellversuchen ratsam erscheinen läßt. Dieser Umstand muß für die Praxis als etwas nachteilig gewertet werden.

In der Literatur über chromatographische Trennungen wird wiederholt darauf hingewiesen, daß bereits geringe Verunreinigungen die adsorptionschromatographische Trennung stark verändern können. Inwieweit die bei toxikologischen Analysen auftretenden Verunreinigungen bei der chromatographischen Entwicklung einer Lösung der isolierten Substanz die ermittelten Trennungen beeinflussen, muß hierbei offen gelassen werden. Eine gute Vorreinigung der Untersuchungslösung wird aber in jedem Fall notwendig sein, damit die zu trennenden Substanzgemische in möglichst reiner Form entwickelt werden können und die Eluate möglichst frei von Verunreinigungen sind.

Bei der Adsorptionschromatographie ist die Adsorptionsisotherme in den weitaus meisten Fällen nicht linear. Daraus ergibt sich, daß bei der Entwicklung der Substanzen verwaschene Zonenränder entstehen können. Infolge der nicht sichtbaren Zonenwanderung der Substanzen auf der Säule und der kleinen Substanzmengen, war es daher teils schwierig, die einzelnen Zonen bei der Elution sicher festzulegen, um beim Aufstellen der Trennung eine Überschneidung der Zonenränder zu vermeiden.

Auf Grund der Langmuir'schen Adsorption ist die relative Lage des Konzentrationsmaximums der Zone stark von der Substanzmenge abhängig. Ein Einhalten der angegebenen Konzentra-

tionsverhältnisse bei der Trennung ist somit annähernd erforderlich, damit ein genügender Fraktionsabstand erhalten bleibt. Bei den Versuchen wurde aufgezeigt, in welchen Konzentrationen Trennungen mit den angegebenen Verfahren möglich sind. Dieses gilt vor allem für die Zone der Barbitale, da die barbitursäurefreien Schlafmittel zuerst eluiert werden.

Ist bei toxikologischen Untersuchungen die ungefähre Barbitalwirkstoffmenge nicht bekannt, so ist durch gravimetrische Bestimmung die Gesamtmenge der Substanz zu ermitteln und dann mit Hilfe der Papierchromatographie der annähernde Barbitalgehalt festzustellen. Bei Vergiftungen werden meist Barbitalmengen vorliegen, wie sie zur Festlegung der Trennungen angewandt wurden.

Um für forensisch-toxikologische Untersuchungen eine noch größere Trennschärfe bei der quantitativen Ermittlung der Schlafmittelgruppen und eine noch weitergehende Unterteilung der Gruppen sowie eine ausreichende Unabhängigkeit des Zonenschwerpunktes von der Substanzkonzentration zu erreichen, sollten weitere Trennungsmöglichkeiten mit Hilfe der Verteilungschromatographie gesucht werden.

C. VERTEILUNGSCHROMATOGRAPHIE ZUR TRENNUNG VON SCHLAFMITTELGRUPPEN

I. Einführung und Besprechung der Literatur

a.) Einleitung

Die Verteilungschromatographie wurde von den Engländern MARTIN und SYNGE entwickelt. Im Prinzip handelt es sich hierbei um eine sehr große Anzahl von kontinuierlichen Verteilungsschritten und um ein laufend sich neu einstellendes Gleichgewicht von gelöstem Stoff in zwei miteinander nicht oder nur beschränkt mischbaren Lösungsmitteln. Der Stoff verteilt sich in den beiden Phasen entsprechend dem Nernst'schen Verteilungssatz, und durch die sich ergebenden Unterschiede im Verteilungskoeffizienten können Stoffgemische aufgetrennt werden.

Bei der Verteilungschromatographie dient der Füllkörper im Idealfall nicht als Adsorbens sondern als Trägerstoff der stationären (meist polaren, hydrophilen) Phase, an der eine zweite, mobile (weniger polare, lipophile) Phase vorbeiströmt. Durch dauernde Verteilung in der beweglichen und unbeweglichen Phase wandern die zu trennenden Stoffe mit bestimmter Geschwindigkeit durch die Säule und trennen sich entsprechend ihrer Löslichkeit in den beiden Lösungsmittelphasen (Verteilungskoeffizient) auf.

Die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei solchen Lösungsmitteln läßt sich theoretisch vom einfachen Ausschütteln im Scheidetrichter bis zur kontinuierlichen Verteilung in großen Gegenstromanlagen, in der Säule (Säulenverteilungschromatographie) oder auf dem Papier (Papierchromatographie) berechnen.

Zur Einarbeitung in die theoretischen und technischen Grundlagen der Verteilungschromatographie standen die zusammenfassenden Darstellungen von HAIS und MACEK; CRAMER; MERCK; BRIMLEY und BARRETT; CASSIDY; NEHER; LEDERER und über die Gesetzmäßigkeit der Gegenstromverteilung die Ausführungen von RAUEN und STAMM zur Verfügung. Außerdem wurden verschiedene

Übersichtsreferate in Zeitschriften und Laboratoriumsmanuale zum gleichen Zweck eingesehen (BÜCHI und SOLIVA; SCHULTZ; DECKER; et alt.).

Eine zusammenfassende Darstellung der physikalischen Gegebenheiten und der technischen Ausführungsmöglichkeiten der Verteilungschromatographie soll an dieser Stelle nicht gegeben werden. Einzelheiten dieser Art aus den erwähnten Schriften oder spezielleren Monographien werden bei der Ausführung der Arbeit entsprechende Erwähnung finden.

b.) In der Literatur verzeichnete verteilungschromatographische Verfahren zur Trennung von Schlafmitteln

1. Verteilungschromatographie an Säulen zur Trennung von Barbitalen und anderen wichtigen Arzneistoffen

SABATINO ermittelte ein verteilungschromatographisches Verfahren zur Trennung verschiedener Barbitale. Der Autor berichtet über die Trennung von fünf Barbitursäurederivaten an einer Kolonne, die unten mit einem Gemisch von 1 g Celite und 1 ml Wasser und darüber mit einer Mischung von 5 g Celite und 5 mg Formamid - Wasser (2:1) beschickt ist. Nach Aufgabe der Barbiturate, die in 5 g Celite eingetragen werden, sind die Wirkstoffe mit Isooctan:Chloroform (1:1) zu eluieren. Ein Eluat von 150 ml des Lösungsmittelgemisches enthält Secobarbital, Pentobarbital, Amobarbital - bei insgesamt 250 ml wird Butabarbital mit eluiert. Phenobarbital wird mit 150 ml Chloroform entwickelt.

Nach LACH, BHANSALI und BLAUG ist eine chromatographische Trennung von Diphenylhydantoin und Phenobarbital an einer Celite-535-Säule, die mit 0,15m-Boratpuffer auf pH 9,2 eingestellt ist, möglich. Die Elution von Diphenylhydantoin erfolgt mit 100 ml Chloroform und von Phenobarbital mit 100 ml einer Mischung n-Butanol-Chloroform (10:90).

Auf eine weitere Publikation von BRÄUNINGER und STENS, die mit Hilfe der Gegenstromverteilung und dem Phasenpaar Chloroform-wäßrige Formamidlösung eine Trennung von bestimmten Barbitursäurederivaten erreichen, sei hier hingewiesen.

Die in der Literatur beschriebenen verteilungschromatographischen Verfahren an Säulen zur Trennung von Schlafmitteln beziehen sich somit hauptsächlich auf Mischungen der Barbitalwirkstoffe, während die barbitursäurefreien Verbindungen oder eine Gruppentrennung aller therapeutisch wichtigen Schlafmittel bis jetzt unberücksichtigt geblieben sind.

Um einen Einblick in den Ablauf und die Möglichkeiten verteilungschromatographischer Trennungen an Säulen zu erlangen, wurden einige in der Literatur verzeichnete Trennungen anderer Arzneistoffe eingesehen. Entsprechende Publikationen wurden vor allem im Hinblick darauf studiert, inwieweit Übertragungsmöglichkeiten einer papierchromatographischen Trennung auf eine Säule gegeben sind und welchen Einfluß die verschiedenen variablen Größen auf eine Trennung ausüben.

JENSEN und SVENDSEN berichten, daß es bei sauren oder basischen Verbindungen zweckmäßig ist, um den Trenneffekt zu erhöhen, den Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten mit den Unterschieden zwischen den Löslichkeitsverhältnissen zu kombinieren. Auf diese Weise konnten Strychnin und Brucin quantitativ an Kieselgur mit Phosphat-Puffer pH 7 als stationäre Phase und Äther (Strychnin) und Chloroform (Brucin) als mobile Phase getrennt werden. GRAF und NEUHOFF beschreiben eine Trennmethode der wasserlöslichen von den wasserunlöslichen Alkaloiden auf gepuffertem Silicagel bei Entwicklung mit Chloroform-Trichloräthylen. Eine Trennung der Secalealkaloide gelang CARLESS mit Zellulosepulver als Träger des Puffers pH 3 und Äther als mobile Phase.

EVANS und PARTRIDGE führten umfassende Untersuchungen über das Verhalten von Hyoscyamin und Scopolamin auf gepufferter Kieselgur. Die Arbeiten sind vor allem aus dem Grunde sehr wertvoll, da die Autoren systematisch die Faktoren, die eine Trennung beeinflussen, unter standardisierten Bedingungen untersuchten.

Weiterhin geben BÜCHI und SOLIVA in ihren Publikationen eine umfassende Darstellung über die Prinzipien der Verteilungschromatographie und über die Möglichkeiten papierchromatographische Trennungen auf Säulen zu übertragen. Die Autoren

erörtern den Einfluß der Pufferlösungen auf chromatographische Trennungen und zeigen auf, daß es mit Hilfe eines entsprechenden pH der stationären Phase gelingt, ionisierende Verbindungen zu trennen. Auf diese Weise gelang es ihnen Antihistaminica und Lokalanästhetica auf Zellulosepulver bei schwach saurem pH der stationären Phase mit Äther aufzutrennen. BETTSCHART und FLÜCK untersuchten gleichfalls die Verhältnisse der Verteilungschromatographie an gepufferten Papieren und ihre angenäherte Übertragung auf eine Säule. Dabei gelang BETTSCHART eine Trennung der Opiumalkaloide auf gepuffertem Hyflo-Super-Cel (Kieselgur).

Aus der sauren Gruppe des organischen Analysenganges wurden verteilungschromatographisch die Phenole untersucht. ZAHNER und SWANN, weiterführend PEARSON ermittelten Trennungen der Phenole an wäßrigem Kieselgur bei Entwicklung mit Cyclohexan.

MEITES gibt ein Verfahren zur chromatographischen Trennung und Isolierung von organischen Säuren (Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure) an, wobei das Silicagel vorher auf einen sauren pH mit 0,5 n-Schwefelsäure eingestellt und mit Butanol-Chloroform eluiert wird.

Verschiedene Arzneimittelgemische trennt BANDES in seine Einzelbestandteile an Celite, das mit einer entsprechenden stationären Phase gemischt und nacheinander mit verschiedenen Lösungsmitteln eluiert wird.

2. Die wichtigsten papierchromatographischen Trennungen der Schlafmittel

Um einen Überblick über die hauptsächlich angewandten papierchromatographischen Auftrennungen der Schlafmittel zu erhalten und daraus Erkenntnisse für eine Übertragung auf eine Säule ableiten zu können, wurden einschlägige Publikationen eingesehen und die Erfahrungen des hiesigen Laboratoriums berücksichtigt. Es sollen nachfolgend nur kurz die wichtigsten papierchromatographischen Trennungen der Schlafmittel hervorgehoben werden, da bereits in der Dissertation von GOEBEL diesbezüglich eine ausführliche Darlegung erfolgte.

In der Praxis werden zur Identifizierung der Barbitalsubstanzen auf dem Papier vor allem nachfolgende Laufmittel von SEIFERT, DEININGER und HÜBNER-PFEIL angewandt:

SEIFERT: Butanol:Ammoniak (25 %):Chloroform = 120:25:55
DEININGER: Isopropanol:Chloroform:Ammoniak (25 %) = 45:45:10
HÜBNER-PFEIL: Butanol:Amylalkohol = 1:1 mit Ammoniak (25 %) gesättigt

Die gleichmäßigste Verteilung der Barbitale über die ganze Länge des Papieres ist mit gutem Trenneffekt beim Laufmittel nach SEIFERT gegeben. Die barbitursäurefreien Schlafmittel liegen hierbei nahe der Laufmittelfront und fallen nicht mit den Rf-Werten der Barbitale zusammen. Letztere würden auch bei diesem Laufmittelsystem theoretisch auf Grund ihrer guten Löslichkeit in der organischen Phase einen ziemlich hohen Rf-Wert aufweisen. Ihre Löslichkeit wird aber durch den Ammoniakzusatz, der zur Dissoziation der Barbitale führt, herabgemindert.

Als saure Laufmittel zur papierchromatographischen Trennung von Barbitalen verwenden PÖHM und WICHTL Toluol:Eisessig :Wasser = 10:4:5 und GOEBEL Toluol:Eisessig = 10:2. Mit dem letzteren Laufmittel werden für die Schlafmittel annähernd gleiche Rf-Werte wie mit dem System nach SEIFERT erhalten.

Weiterhin konnte GOEBEL papierchromatographisch eine Auftrennung der Sedativa (Noludar, Persedon, Doriden, Valamin) und ihre Abtrennung von den Barbitalen mit dem Laufmittel Toluol:Ammoniak (25 %) = 10:1 bewirken. Auch hierbei werden die Barbitale in die dissoziierte Form übergeführt, wobei die Löslichkeit in dem apolaren Lösungsmittel so stark absinkt, daß die Barbitale infolge der Änderung des Verteilungskoeffizienten auf dem Startpunkt zurückbleiben.

c.) Diskussion der verteilungschromatographischen Möglichkeiten an der Säule

Aus den erwähnten papierchromatographischen Trennungen lassen sich im Prinzip gewisse Rückschlüsse für die Säulenchromatographie ableiten. Eine direkte Übertragung dieser

Trennungen auf eine Säule wird jedoch kaum in Frage kommen können, da die Entwicklung mit stark ammoniakalischen Laufmitteln auf der Säule nicht gut möglich ist. Zum anderen muß hierbei bedacht werden, daß der Säulenchromatographie ein mehr präparativer Charakter zukommt und das zusätzliche variable Größen die Trennungen beeinflussen. Eine Vororientierung an Hand von Papierchromatogrammen ist ohne weiteres möglich, es müssen jedoch auf der Säule die Feinheiten der Trennungen immer neu erarbeitet werden.

Eine theoretische Möglichkeit zu einer Trennung der Schlafmittelgruppen leitet sich aus den papierchromatographischen Verhältnissen in dem Sinne ab, daß bei Ausbildung eines stark basischen oder sauren pH in der stationären Phase und bei Wahl eines geeigneten Lösungsmittels eine Auftrennung möglich sein müßte.

Der Verteilungskoeffizient ist eine einfache Funktion des pH der wäßrigen Phase. Dieses bedeutet, daß die Beeinflussung des Verteilungskoeffizienten durch die Wasserstoffionenkonzentration zu einer analogen Wirkung auf die R- oder Rf-Werte führt. Durch Einbringen von Puffern in die stationäre Phase lassen sich, unter Berücksichtigung gewisser pH-Verschiebungen, die verschiedenen pH-Gebiete einstellen und für eine Trennung ausnützen.

Je nach der Größe der Dissoziationskonstanten wird die Salzbildung in der pH-Skala früher oder später einsetzen und die gebildeten Salze werden dann andere Lösungseigenschaften aufweisen. Dieses Verhalten ist für die Verteilung besonders wertvoll und läßt sich für eine Auftrennung der Substanzen ausnützen, weil es mehr individueller Natur ist als die Löslichkeitseigenschaften.

Da ein wesentlicher Unterschied in den Dissoziationskonstanten zwischen der Barbital-Gruppe und der Gruppe der barbitursäurefreien Verbindungen gegeben ist, müßte es somit bei einem bestimmten pH möglich sein, einen genügend großen R-Unterschied auf der Säule zu erzeugen.

Hierbei hat das Lösungsmittel gleichfalls entscheidenden Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Salze, so daß

der Unterschied durch die entsprechende Wahl der Lösungsmittel noch weiter vergrößert werden kann. Um ausreichend abweichende R-Werte, die die Bewegung des Konzentrationsmaximums der Zone im Verhältnis zur Bewegung der Flüssigkeit in der Säule angeben, für die beiden Schlafmittelgruppen zu erhalten, wird es somit vorteilhaft sein, den Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten mit dem Unterschied der Löslichkeitsverhältnisse in den Lösungsmitteln gleichsinnig zu kombinieren.

II. Verteilungschromatographische Untersuchungen an Säulen

a.) Untersuchungen zur Festlegung der variablen Größen der Verteilungschromatographie

1. Auswahl des Lösungsmittels

Durch Vorversuche sollten einige variable Größen, wie Lösungsmittel und geeignetes pH orientierend ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Löslichkeitsversuche durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 0,5 g der zu untersuchenden Substanzen bei 20° C zu 5 ml verschiedener organischer Lösungsmittel zugesetzt und ihre Löslichkeit vergleichend zueinander ermittelt.

Es ergaben sich die folgenden in Tabelle 5 zusammengestellten Löslichkeiten.

Tab. 5 *Löslichkeit der therapeutisch wichtigsten Schlafmittel*
(Verhältnis Substanz · Lösungsmittel = 1 · 10)

Lösungsmittel	Adalin	Abasin	Bromural	Valamin	Doriden	Persedon	Noludar	Evipan	Prominal	Medomin	Noctal	Phanodorm	Luminal	Veronal	Dial
Wasser	-	-	-	-	-	(+-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+-)
Aethylacetat	+	+	+	+	+	+	+	+	(+-)	(+-)	+	+	+	+	(+-)
Aether	+	+	+	+	+	+	+	(+-)	(+-)	+	+	+	+	+	(+-)
Methylenchlorid	+	+	+	+	+	+	+	+	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	-	-	-
Chloroform	+	+	+	+	+	+	+	+	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	-
Dichloräthan	+	+	+	+	+	+	+	(+-)	(+-)	-	-	-	-	-	-
Benzol	+	+	(+-)	+	+	+	+	(+-)	-	-	-	-	-	-	-
Toluol	(+-)	(+-)	(+-)	(+-)	+	(+-)	(+-)	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclohexan	(+-)	-	-	-	(+-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anmerkung: leicht löslich +, löslich (+-), schwerer löslich -

Aus der Löslichkeitstabelle geht hervor, daß vor allem eine ausgeprägt unterschiedliche Löslichkeit der Schlafmittel in Dichloräthan besteht. Alle zu untersuchenden barbitursäurefreien Substanzen sind in diesem Lösungsmittel leicht löslich, während die Barbitale eine erheblich geringere Löslichkeit aufweisen. In alkalischem Medium, das eine Erhöhung der Löslichkeit der Barbitale in der stationären wäßrigen Phase bewirkt, wird die Löslichkeit in der organischen Phase soweit vermindert werden können, daß wesentlich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Gruppen auf der Säule zu erwarten sind.

METZSCH berichtet, welche Anforderungen an die Lösungsmittel bei der Verteilung gestellt werden müssen. Unter anderem gibt der Autor an, daß ein Arbeiten in einem bestimmten pH-Bereich günstig ist, damit eine Assoziation der Verbindungen bei einigen Lösungsmitteln ausgeschlossen und der Verteilungskoeffizient möglichst unabhängig von der Konzentration wird. Dadurch könnte eine annähernd lineare Verteilungsisotherme erreicht werden. Weiterhin wird angeführt, daß nach heutiger Auffassung die meisten Autoren darin übereinstimmen, daß die Tendenz zur H-Brückenbildung vorwiegend die Löslichkeit bestimmt und nicht die Polarität ausschlaggebend ist.

Bei der Auswahl der Lösungsmittel für die Säulenchromatographie muß außerdem bedacht werden, daß sich die entwickelten Substanzen aus der organischen Phase verlustlos und schonend aufarbeiten lassen, weshalb hochsiedende Lösungsmittel nicht geeignet erscheinen.

Die zur Verteilung von Substanzen geeigneten Lösungsmittel lassen sich somit nicht mit gleichem Vorteil, sowohl für papierchromatographische Zwecke als auch für die Säulenchromatographie anwenden. So ist Butanol, mit dem papierchromatographisch sehr gute Trennungen erhalten werden, für die Säulenchromatographie nicht günstig, da es relativ viskos ist und vor allem langsam destilliert (Sdp. 118° C). Dadurch würde das Aufarbeiten der verteilten Substanzen aus den säulenchromatographischen Fraktionen erschwert, ebenso würde eine

Zersetzung und eine Sublimation der Substanzen möglich sein.

Aus diesem Grunde galt es für die nachfolgenden säulenchromatographischen Versuche ein solches Lösungsmittel zu wählen, das einen möglichst niedrigen Siedepunkt hat. Die Löslichkeitsversuche hatten ferner gezeigt, daß wohl vornehmlich apolare Lösungsmittel für die Trennung in Frage kommen, welche keine Befähigung zur H-Brückenbildung besitzen (oder dann als Donator-Lösungsmittel wirken), da sonst eine zu gute Löslichkeit in der mobilen Phase bestände und für eine Trennung nicht genügend unterschiedliche R-Werte erhalten werden könnten.

Bei Auswahl der apolaren Lösungsmittel erschien Dichloräthan auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeiten der zu untersuchenden Gruppen und vor allem wegen des verhältnismäßig niedrigen Siedepunktes (Sdp. 84° C) am geeignetsten. Letzteres ist vor allem aus dem Grunde wesentlich, da einige barbitursäurefreie Schlafmittel wie Valamin ab 60° C (SCHEIBL), Persedon ab 75° C (LANG) und Adalin zwischen 60° bis 80° C (DAB VI) in geringem Maße sublimieren. Versuche mit Valamin zeigten, daß diese Sublimation bei starker Erwärmung auf dem Wasserbad zum Abdampfen des Lösungsmittels bereits zu beobachten ist.

Um Verluste der erwähnten Substanzen vor allem von Valamin zu vermeiden, ist es daher notwendig, die Lösungsmittel unter starkem Luftzug und bei entsprechend gelinder Erwärmung auf dem Wasserbad abzudampfen. Entsprechende Probeversuche bewiesen, daß unter den letztgenannten Bedingungen quantitative Ausbeuten dieser Substanzen erhalten werden.

Wie sich bei der Fortsetzung der Arbeit herausstellte, ist unter diesen Abdampfbedingungen noch eine quantitative Rückgewinnung der Substanzen aus Toluol und Cyclohexan trotz ihrer höheren Siedepunkte gegeben, so daß auch diese apolaren Lösungsmittel für Trennungen an der Säule angewandt werden konnten.

2. Feststellung des optimalen pH für die stationäre Phase

Es mußte ein pH ermittelt werden, das geeignet ist, die Barbitale möglichst vollständig in ihre Salzform zu überführen.

Aus den Ausschüttelungsversuchen von BÜCHI und PERLIA, die die Barbitale fast quantitativ (99 %) aus Äther mit 2 %iger Sodalösung ausschütteln konnten, ist zu entnehmen, daß hierbei die Barbitale fast vollständig in die dissozierte Form überführt werden. Bei Anwendung von 5 %iger Natriumbikarbonatlösung verblieben bis zu 73 % der eingewogenen Menge nach der Ausschüttelung im Äther zurück. Bei bikarbonat-alkalischer Reaktion ist also die Salzbildung offensichtlich nicht vollständig.

Anschließend durchgeführte Ausschüttelungsverfahren sollten auch bei Anwendung von Dichloräthan die erwähnten Verhältnisse für einige zu untersuchende Wirkstoffe bestätigen. Zu diesem Zweck wurden 20 mg der Barbitale unter schwachem Erwärmen in 15 ml Dichloräthan gelöst und anschließend auf 20 ml aufgefüllt. Die barbitursäurefreien Substanzen wurden in 20 ml Dichloräthan gelöst. Diese Lösungen wurden mit 20 ml 2 %iger Natriumkarbonat- oder 5 %iger Natriumbikarbonatlösung ausgeschüttelt, und nach Abtrennung der Phasen wurde die im Dichloräthan verbleibende Substanzmenge gravimetrisch bestimmt.

Im Dichloräthan blieben dabei prozentual folgende Wirkstoffmengen zurück:

	Luminal	Veronal	Bromural	Adalin	Valamin
pH 10,8 (Na_2CO_3-Lsg.)	0 %	0 %	94 %	98 %	100 %
pH 8,0 ($NaHCO_3$-Lsg.)	54 %	40 %	100 %	100 %	100 %

Die Versuche bestätigen, daß die Salzbildung der Barbitale auch bei einer Ausschüttelung des Dichloräthan mit Sodalösung (pH 10,8) erfolgt, während die anderen Sedativa fast vollständig im Dichloräthan verbleiben. Bei niederem pH ist nach diesen Versuchen die Salzbildung der Barbitale als nicht quantitativ anzusehen.

Der größte Unterschied der zu trennenden Gruppen ergibt sich somit bei der Ausschüttelung des Dichloräthan mit Natriumkarbonatlösung. Bei Anwendung einer Natriumkarbonatlösung als stationäre Phase und Dichloräthan als mobile Phase müßten sich dementsprechende Verhältnisse auch auf eine Säule übertragen lassen.

Hierbei müßten die Wanderungsunterschiede der beiden Gruppen auf der Säule genügend unterschiedlich sein. Um die Verteilungsverhältnisse vor allem für die langsamer wandernden Barbitale bei den verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen und dem Lösungsmittel Dichloräthan oder Äther zu klären, wurden vor Anwendung der Säule entsprechende papierchromatographische Untersuchungen durchgeführt.

Hierzu wurden imprägnierte Papiere (Schleicher und Schüll 2045b) mit verschiedener pH-Abstufung hergestellt, indem sie langsam und gleichmäßig durch Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,8, Borax-Kaliumbiphosphat-Puffer pH 9,2 und Natriumkarbonatlösung pH 10,8 gezogen wurden. Die nassen Bogen wurden kurz abtropfen gelassen und hierauf zwischen Filterpapier vorgetrocknet. Zur vollständigen Trocknung hingen die Papiere 12 Stunden an der Luft. Danach wurden 100 γ der einzelnen Barbitale aufgetragen.

Diese so bereiteten Papiere wurden 24 Stunden in einer wassergesättigten Atmosphäre klimatisiert und anschließend in eine wassergesättigte Dichloräthan oder wassergesättigte Äther Atmosphäre eingehangen. Nach einstündigem Klimatisieren in dieser Atmosphäre wurde absteigend entwickelt. Nach Trocknung der Papiere (30 Minuten bei 70° C) wurden die Barbitale sichtbar gemacht.

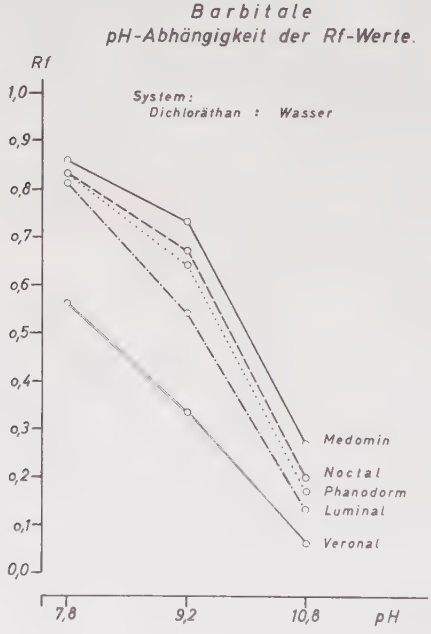
Die Detektion der Barbitale auf gepuffertem oder mit Sodalösung vorbehandeltem Papier war, wie vorher durch Versuche ermittelt wurde, mit Goldchlorid möglich. Dabei wurden die Chromatogramme zuerst leicht mit äthanolischer Natronlauge (2 %) übersprüht und nach dem Antrocknen mit einer Lösung nachgesprüht, die 15 Tropfen einer 50 %igen wäßrigen Goldchloridlösung in 20 ml Aceton enthielt. Dabei bilden sich beim Trocknen nach kurzer Zeit auf braun-grauem Hintergrund weiße Flecken aus. Evipan und Prominal werden hierbei nur wenig empfindlich angezeigt.

Die Barbitale können jedoch auch mit Quecksilber-I-nitrat auf alkalischen Papieren einigermaßen sichtbar gemacht werden. Diese Methode ist zwar nicht spezifisch, war jedoch für den vorliegenden Zweck (100 γ) ausreichend.

Dabei wurde jedes einzelne Chromatogramm in eine gesonderte Schale mit 1 %iger wäßriger Quecksilber-I-nitratlösung gebracht und etwa eine Minute darin belassen. Nach leichtem Abspülen mit Wasser ergaben sich auf dunkelgrauem Untergrund hellbraune bis braune Flecken, die besonders auf der Rückseite des Papieres deutlich hervortraten.

Die unter diesen Arbeitsbedingungen erhaltenen Rf-Werte von fünf Barbitalen sind in Abhängigkeit zu dem entsprechenden pH-Wert in Abb. 9 für das System Dichloräthan-Wasser dargestellt. Es ergibt sich daraus, daß bei pH 10,8 die geringste Wanderungsgeschwindigkeit der Barbitale mit Dichloräthan besteht, woraus sich für eine Säule die besten Trennungsverhältnisse ableiten lassen.

Abb. 9



Bei dem System Äther-Wasser liegen die Rf-Werte der Barbitale bei pH 7,8 und 9,4 nahe der Frontlinie (Rf=0,90-0,95),

während auf den mit Sodalösung imprägnierten Papieren für die Barbitale folgende Rf-Werte ermittelt wurden: Medomin 0,85, Noctal 0,80, Phanodorm 0,65, Luminal 0,40 und Veronal 0,2 . Es erfolgt wohl hierbei eine Auftrennung der Barbitale, doch werden durch zu gute Löslichkeit der dissoziierten Verbindungen in der organischen Phase zu hohe Wanderungsgeschwindigkeiten erzielt, so daß dieses letztere Laufmittel für eine Trennung der zu untersuchenden Gruppen auf der Säule auszuschließen ist.

7. Betrachtungen über weitere variable Größen der Säulenverteilungschromatographie

Bei der Verteilungschromatographie an einer Säule sind weitere steuerbare Größen zu berücksichtigen. Diese sollen hier kurz zusammenfassend erörtert werden.

1. Die Durchflußgeschwindigkeit der mobilen Phase kann auf einer Säule nach Belieben geändert werden. Nach EVANS und PARTRIDGE kann die Laufgeschwindigkeit stark variiert werden. Geschwindigkeitsunterschiede von 2,5 ml/Min. und 13 ml/Min. sollen das Elutionsdiagramm nur sehr wenig beeinflussen.

Als Maß für das Gleichgewicht des Stoffes zwischen den beiden Phasen ist nach HUNTER und NASH; BARRY hauptsächlich die Zeit des Kontaktes und die gegenseitige Berührungsfläche entscheidend. Obige Tatsache spricht somit für eine große Oberfläche der stationären auf einem Träger verteilten Phase und für einen sehr raschen Austausch der gelösten Stoffe zwischen den beiden Phasen.

2. Während bei der Papierchromatographie das Mengenverhältnis der beiden Phasen durch die Papiersorte und das betreffende Lösungsmittel gegeben ist, können diese Verhältnisse auf der Säule durch Änderung des Volumens der stationären Phase weitgehend verändert werden. Nach BÜCHI und SOLIVA ist das Ausflußvolumen bis zum Erscheinen der Zonenspitze im Eluat bei gegebenem pH vom Volumen an stationärer Phase abhängig. Bei Zellulosepulver soll der Gehalt der gepufferten stationären Phase nicht mehr als 25-30 % und bei Kieselgur nicht mehr

als 80-90 % des Gewichtes der Stützphase betragen.

3. Die Konzentration der zur Verteilung gelangenden Stoffe und vor allem die Konzentration der Zusätze (Salze, Puffer) zur stationären Phase können den Verteilungskoeffizienten und somit den R-Wert auf der Säule beeinflussen. Durch eine Erhöhung der Pufferkonzentration kann wohl die Stabilität eines pH besser gewährleistet werden, andererseits ist mit einem Aussalzeffekt aus der wäßrigen Phase zu rechnen, so daß sich Zonenverschiebungen ergeben können. Die Kapazität kann somit nicht durch einfache Erhöhung der Konzentration gesteigert werden,und die Molarität soll nicht zu hoch gewählt werden (BÜCHI und SOLIVA).

Eine Veränderung des pH durch die zu trennenden Substanzen läßt sich vor allem bei Verwendung relativ geringer Puffermengen in der stationären Phase in der Regel nicht verhindern. Es wird somit erforderlich sein, bei Aufstellung einer Säule geringe pH-Verschiebungen mit zu berücksichtigen und ein ausreichendes pH-Gebiet zu wählen.

4. Es ist ferner darauf zu achten, daß der Zusatz in der stationären Phase der Säule durch das Elutionsmittel nicht ausgewaschen wird. Natriumkarbonat oder Phosphate, die sich in den organischen Lösungsmitteln - vor allem den apolaren - sehr schwer lösen, werden sich deshalb als Zusätze zur wäßrigen Phase am besten eignen.

5. Bei einem reinen Verteilungsvorgang wird die Dimension einer Säule nur einen geringen Einfluß auf den Trenneffekt der Substanzen ausüben. Dabei ist jedoch zu beachten, daß mit der Höhe einer Säule auch die Zahl der theoretischen Böden und die Anzahl der Verteilungsschritte wächst. Dadurch wird die Basis der Verteilungskurven schmaler und damit verringert sich das Elutionsvolumen, d.h. das zur völligen Elution einer Substanz notwendige Volumen. Allerdings besteht in hohen Säulen, vor allem bei sehr langsamer Laufgeschwindigkeit des Elutionsmittels, die Gefahr der Diffusion.

6. Für die Säulenverteilungschromatographie ist es notwendig, einen möglichst indifferenten Träger auszuwählen. Als günstig haben sich bis jetzt Zellulosepulver, Silicagel,

Kieselgur, Stärke und andere pulverförmige Träger erwiesen.

Die stationäre Phase wird bei Silicagel mehr oder weniger geordnet in einem Netzwerk submikroskopischer Kristalle festgehalten. Es ist daher schwierig die Adsorption der Stoffe hierbei vollständig auszuschalten. MARTIN und SYNGE, die als erste die verteilungschromatographische Methode auf Silicagel zur Auftrennung von Acetylaminosäuren anwandten, wiesen schon darauf hin.

Nach MARTIN ist Kieselgur als Träger besser geeignet, da die Skelette der Diatomeen aus relativ dichterem SiO_2 bestehen. Verschiedene Sorten bedürfen jedoch einer guten Vorreinigung und zeigen immer noch Adsorption.

EVANS und PARTRIDGE fanden am geeignetsten die Kieselgursorten Hyflo-Super-Cel und Celite-545, die die vorgeschlagene Probe auf negative Adsorption bestanden und ohne Vorbehandlung verwendet werden können.

Als am indifferentesten ist von allen hier erwähnten Trägern Zellulosepulver anzusehen.

Zur Auffindung einer verteilungschromatographischen Gruppentrennung der Schlafmittel wurde daher als Träger der stationären Phase vor allem Zellulosepulver Nr. 123a von der Firma "Schleicher und Schüll" ausgewählt, da hier die größte Aussicht auf eine lineare Verteilungsisotherme der Stoffe gegeben war.

Weiterhin wurde standardisiertes Kieselgel "Merck" mit 0,2-0,5 mm Korngröße und einer Aktivitätsstufe von etwa IV auf seine Eignung für eine verteilungschromatographische Gruppentrennung der Schlafmittel untersucht.

b.) Verteilungschromatographische Untersuchungen zur Trennung der Schlafmittelgruppen an Kieselgelsäulen

1. Versuchsanordnung

Die verteilungschromatographischen Untersuchungen wurden mit Kieselgel "Merck" (0,2-0,5 mm), das eine gute Durchlaufgeschwindigkeit aufweist, ausgeführt. Hierzu wurde dieses Kie-

selgel mit einer entsprechenden Menge von Natriumkarbonatlösung - als stationäre Phase - in einer flachen Schale angerieben und 48 Stunden gut verschlossen stehen gelassen. Anschließend daran wurde das imprägnierte Kieselgel portionsweise unter Anstopfen in das leere Chromatographierohr (Glasrohr mit Hahn, Ø 1,8 cm, Länge 65 cm) eingefüllt, ca. 60 ml wassergesättigtes Dichloräthan aufgegeben und bis zum oberen Rand der Säulenfüllung einfließen gelassen.

Auf diese vorbereitete Säule wurde 1 g reines Kieselgel, das mit der ätherischen Lösung des zu untersuchenden Schlafmittels imprägniert war, aufgebracht. Die Säule wurde dann mit Watte abgedeckt und wassergesättigtes Dichloräthan zur Entwicklung der Substanzen aufgegeben. In den Eluaten wurden die eluierten Schlafmittel nach dem Verdampfen der Lösungsmittel gravimetrisch und papierchromatographisch bestimmt. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 1 ml/Min.

2. Untersuchungsergebnisse

α.) Feststellung der günstigsten Trennungsbedingungen

Um geeignete Trennungsbedingungen der Schlafmittelgruppen aufzufinden, wurden unter Beibehaltung des Laufmittels Dichloräthan und des pH der stationären Phase, die durch die Vorversuche ermittelt worden waren, die weiteren variablen Größen der Säule und zwar vor allem das Volumen und die Konzentration an Natriumkarbonatlösung zur Ausbildung der stationären Phase sowie auch die Säulenlänge verändert.

Das Volumen der stationären karbonathaltigen Phase war bei einem Verhältnis von 6 Volumteilen Sodalösung zu 10 Gewichtsteilen Kieselgel ausreichend. Hierbei bildet das Kieselgel eine gleichmäßig feuchte Masse und kann gut zur Säulenfüllung verwandt werden. Um jedoch die Sicherheit zu gewährleisten, daß sich im Kieselgel bei diesem Verhältnis eine gleichmäßige stationäre Phase ausbildet, wurde das imprägnierte Kieselgel noch 48 Stunden gut verschlossen stehen gelassen.

Für die anschließenden Versuche wurden folgende Säulen hergestellt:

a) 20 g Kieselgel imprägniert mit 12 ml 1m-(2m-) Natriumkarbonatlösung
b) 40 g Kieselgel imprägniert mit 24 ml 1m-(2m-) Natriumkarbonatlösung

zu a) Aus den Schlafmittelgruppen wurden Noctal, Luminal, Bromural und Doriden ausgewählt und an den Kieselgel-Säulen in Mengen zu je 10 mg mit wassergesättigtem Dichloräthan im Einzelversuch entwickelt.

Die Elutionskurven (Abb. 10) dieser Wirkstoffe zeigen, daß auf dem Kieselgel, das mit 1m-Natriumkarbonatlösung imprägniert ist, keine genügende Trennung des Bromural von Noctal erzielt wird. Bei der Entwicklung an einer Kieselgel-Säule, die mit 2m-Natriumkarbonatlösung imprägniert ist, wird Noctal erst nach der vollständigen Elution von Bromural, dessen Elutionsmaximum sich von dem des vorhergehenden Versuches nicht unterscheidet, eluiert.

Durch eine größere Konzentration an Natriumkarbonat in der stationären Phase konnte so der R-Abstand von Bromural und Noctal erweitert und eine Trennung der beiden Substanzen erreicht werden.

Der Unterschied im chromatographischen Verhalten der beiden Komponenten war jedoch noch zu gering, um darauf eine Gruppentrennung der Schlafmittel aufbauen zu können. Eine weitere Möglichkeit, den Trenneffekt zu steigern, wurde in einer Verlängerung der Säule gesehen, damit die zu entwickelnden Substanzen eine größere Wegstrecke durchlaufen müssen und mehr Verteilungsstufen möglich sind.

zu b) Nach obiger Überlegung wurden je 10 mg Bromural und Noctal an einer 40g-Kieselgel-Säule, die mit 24 ml 1m-Natriumkarbonatlösung imprägniert war, mit Dichloräthan entwickelt. Die erhaltenen Elutionskurven sind in Abb. 11 dargestellt.

Es zeigt sich hierbei, daß der Trenneffekt durch die Verlängerung der Säule tatsächlich verbessert wird. An einer 40g-Kieselgel-Säule mit einer stationären Phase von 24 ml

Abb. 10

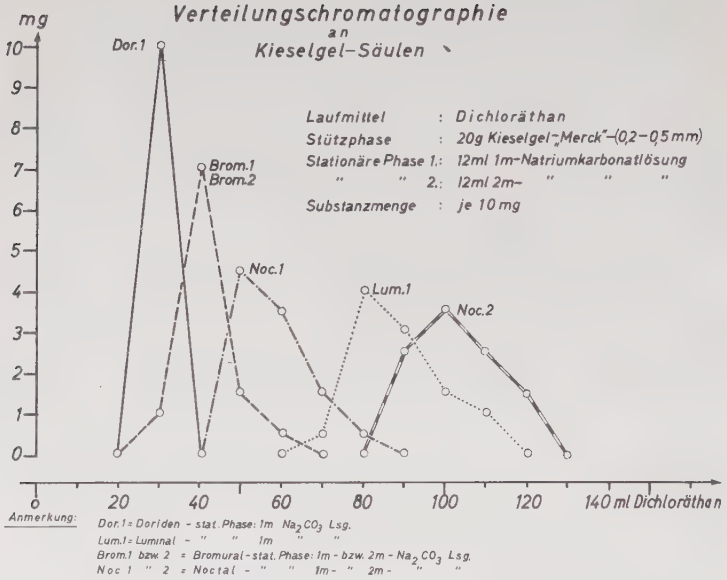
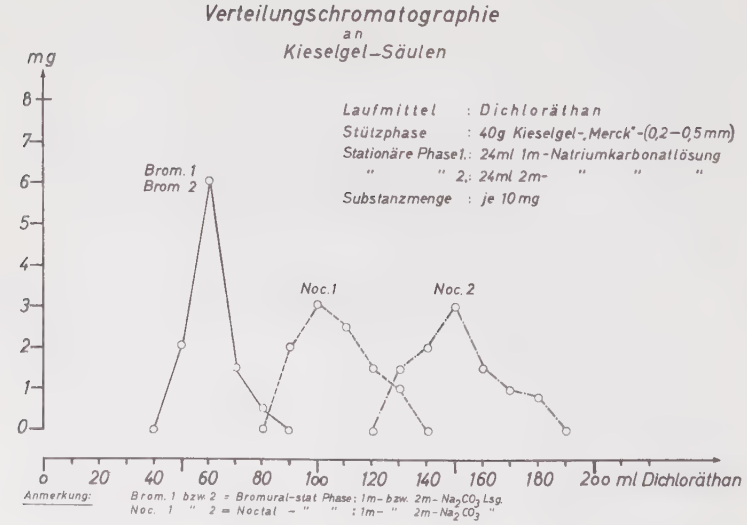

Verteilungschromatographie
an
Kieselgel-Säulen
mg
Dor.1
Brom.1
Brom.2
Noc.1
Lum.1
Noc.2
Laufmittel : Dichloräthan
Stützphase : 20g Kieselgel-„Merck"-(0,2-0,5mm)
Stationäre Phase 1.: 12ml 1m-Natriumkarbonatlösung
" " 2.: 12ml 2m- " " "
Substanzmenge : je 10 mg
0 20 40 60 80 100 120 140 ml Dichloräthan
Anmerkung:
Dor.1 = Doriden - stat. Phase: 1m Na2CO3 Lsg.
Lum.1 = Luminal - " " 1m " "
Brom.1 bzw. 2 = Bromural - stat. Phase: 1m - bzw. 2m - Na2CO3 Lsg.
Noc 1 " 2 = Noctal - " " 1m - " 2m - " "

Abb. 11


Verteilungschromatographie
an
Kieselgel-Säulen
mg
Brom. 1
Brom 2
Noc.1
Noc. 2
Laufmittel : Dichloräthan
Stützphase : 40g Kieselgel-„Merck"-(0,2-0,5mm)
Stationäre Phase1.: 24ml 1m-Natriumkarbonatlösung
" " 2.: 24ml 2m- " " "
Substanzmenge : je 10 mg
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 ml Dichloräthan
Anmerkung:
Brom. 1 bzw 2 = Bromural-stat Phase: 1m- bzw. 2m- Na2CO3 Lsg.
Noc. 1 " 2 = Noctal - " " : 1m- " 2m- Na2CO3 "

2m-Natriumkarbonatlösung ist der Elutionsunterschied zwischen Bromural und Noctal am größten. Damit wurde ein ausreichender Abstand in der Entwicklung beider Substanzen geschaffen und günstige Bedingungen für die Gruppentrennung ermittelt.

β.) Trennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen an Kieselgel

Die zu untersuchenden Schlafmittel wurden nach obigen Ergebnissen an einer 40g-Kieselgel-Säule, die als stationäre Phase 24 ml 2m-Natriumkarbonatlösung enthielt, in Mischungen zu je 10 mg mit wassergestättigtem Dichloräthan entwikkelt und in den Eluaten papierchromatographisch bestimmt.

Wie aus der Tabelle 6 ersichtlich ist, werden mit 125 ml Dichloräthan die barbitursäurefreien Substanzen eluiert, während die Barbitale auf der Säule verbleiben.

Eine Ausnahme von den Barbitalen kommt auf Grund ihrer Löslichkeit Evipan und Prominal zu, die mit der Gruppe der Nichtbarbitale eluiert werden.

Obwohl bei der Ausführung dieser Versuche nicht jedes Schlafmittel einzeln gravimetrisch in den Eluaten bestimmt und ein Elutionsdiagramm erstellt wurde, läßt der papierchromatographische Nachweis der Schlafmittel in den anfallenden Eluaten und auch der Vergleich des Säulenchromatogrammes Noctal-Bromural (Abb. 11 - unter denselben Verhältnissen) ohne weiteres den Schluß zu, daß die barbitursäurefreien Schlafmittel sich in dieser Weise von den Barbitalen (außer Evipan und Prominal) quantitativ abtrennen lassen.

Eine Schwierigkeit bei dieser Auftrennungsmethode ergab sich bei der nachfolgenden Elution der Barbitale - vor allem von Veronal und Luminal. Um eine quantitative Elution der gesamten Barbitale zu erreichen, müssen nach der Entwicklung mit Dichloräthan polare Laufmittel zur Anwendung gebracht werden. Mit 50 ml eines Gemisches von Dichloräthan:Aceton= 4:1 oder mit 50 ml Äther wurden jedoch die Barbitale vor allem Veronal und Luminal nur unvollständig eluiert.

Um die Barbital-Gruppe vollständig von der Kieselgel-Säule

Tabelle 6

Verteilungschromatographie an 40g Kieselgel mit einer stationären Phase von 24 ml 2m-Natriumkarbonatlösung bei Entwicklung mit Dichloräthan

Nr.	Frakt.	Lösungsmittel	Entwickelte und eluierte Substanzen (Subst.Menge: je 10mg)										
			Doriden	Valamin	Noludar	Bromural	Persedon	Evipan	Prominal	Medomin	Noctal	Luminal	Veronal
1.	25	Dichloräthan	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	25	Dichloräthan	+	+	+	(+)	+	+	+	-	-	-	-
3.	50	Dichloräthan	-	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4.	25	Dichloräthan	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
5.	50	Dichloräthan:Aceton 4 : 1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Papierchromatographische Reaktion:

Zeichenerklärung: + stark positiv
(+) schwach positiv
- negativ

eluieren zu können, müßten somit noch stärker polare Laufmittel zur Anwendung gebracht werden. Dieses erschien jedoch aus dem Grunde nicht ratsam, weil die stationäre Phase eine verhältnismäßig hohe Natriumkarbonatkonzentration aufwies, so daß bei einer nachfolgenden Elution mit stärker polaren Lösungsmitteln Natriumkarbonat in die Eluate ausgewaschen würde. Dieses könnte dann bei der gravimetrischen Bestimmung der Schlafmittel in den Fraktionen zu Fehlschlüssen führen.

Außerdem ist neben der reinen Verteilung der Schlafmittel auf dieser Säule eine Adsorption der Wirkstoffe an den Träger Kieselgel nicht auszuschließen. Die verhältnismäßig große Menge an Dichloräthan, die zur vollständigen Eluierung der barbitursäurefreien Schlafmittel notwendig ist, (was einer sehr breiten Zone auf der Säule entspricht), deutet schon darauf hin, daß bei dieser Trennung nicht nur ein reiner Verteilungsvorgang vorliegt.

Aus diesen Gründen erschien es ratsam, Zellulosepulver als indifferentesten Träger für eine verteilungschromatographische Schlafmitteltrennung heranzuziehen.

c.) Verteilungschromatographische Untersuchungen zur Trennung der Schlafmittelgruppen an Zellulosesäulen

1. Versuchsanordnung

α.) Herstellung der Säule

Zellulosepulver von "Schleicher und Schüll" Nr. 123a wurde in einer breiten Schale mit einer entsprechenden Menge an stationärer Phase angerieben.

Da die Säule nicht durch Sedimentieren im Lösungsmittel gebildet werden kann, wurde nach BETTSCHART verfahren und das imprägnierte Zellulosepulver in kleinen Anteilen in das leere Chromatographierohr (Glasrohr mit Hahn, ⌀ 1,8 cm, Länge 45 cm, unten mit Watte abgeschlossen) eingefüllt. Durch mäßiges Anpressen jeder Zelluloseportion mit einem unten abgeflachten Glasstab wurde die Säule gleichmäßig gestopft.

Diese Säulenfüllung verlangt wohl eine gewisse Sorgfalt und

Zeit, doch konnten bei gleichmäßigem Einbringen des imprägnierten Zellulosepulvers in das Chromatographierohr gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

β.) Allgemeine Versuchsbedingungen

1. Alle mobilen Phasen wurden mit der betreffenden stationären Phase gesättigt und bei Zimmertemperatur bis zur vollständigen Klärung der organischen Phase stehen gelassen.

2. Vor dem Aufbringen der zu entwickelnden Substanzen auf die Säule wurden 60 ml der gesättigten mobilen Phase bis zum oberen Rand der Säulenfüllung durchfließen gelassen. Das abfließende Lösungsmittel (ca. 35 ml), das anfänglich leicht bräunlich gefärbt war, wurde verworfen.

Nach diesem Durchlauf des Lösungsmittels konnten keine wägbaren Rückstände beim Verdampfen der mobilen Phase festgestellt werden, so daß nunmehr die Reinheit des Zellulosepulvers für eine nachfolgende gravimetrische Bestimmung der Wirkstoffe in den Fraktionen ausreichte. Bei spektrophotometrischen Untersuchungen wird es jedoch erforderlich sein, daß das Zellulosepulver zur Reinigung mit den zur Anwendung gelangenden Lösungsmitteln vorher extrahiert wird (MAZEK).

Das in der Säule stehende Lösungsmittelvolumen betrug vor der Entwicklung ca. 25 ml. Ehe somit die Lösungsmittelfront beim Entwickeln durch die Säule wandert, muß erst dieses Lösungsmittelvolumen aus der Säule verdrängt werden. Bei der Angabe des Volumens, das ausfließt bis die Bandenspitze im Eluat erscheint ("Ausflußvolumen"), müßte also das in der Säule stehende Lösungsmittelvolumen in Abzug gebracht werden.

Für die nachfolgend erstellten Elutionsdiagramme wurde dieses nicht berücksichtigt, um eine genauere Übersicht über die Elution der Substanzen zu gewährleisten. Die Elutionskurven zeigen somit den Auslauf des Lösungsmittels nach der Aufgabe der Wirkstoffe auf einer mit dem Laufmittel vorher ins Gleichgewicht gebrachten Zellulosesäule.

3. Da die Barbitale in den für die Entwicklung verwendeten apolaren Lösungsmitteln meist schwer löslich sind, war ein

Aufbringen der Substanzen auf die Säule in Form einer konzentrierten Lösung nicht möglich. Daher wurden die Wirkstoffe in 5 ml Äther gelöst und mit 1,5 g reinem Zellulosepulver vermischt. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde das mit der Substanz beladene Zellulosepulver sorgfältig auf die vorbereitete Säule aufgebracht und mit 0,5 g reinem Zellulosepulver und Watte abgedeckt.

Anschließend daran wurde die über der Säulenfüllung befindliche Wandung des Rohres viermal mit 3 ml der ersten mobilen Phase nachgespült und danach die mobile Phase zur Entwicklung aufgegeben.

4. Die Eluate wurden in einem starken Luftstrom bei geringer Erwärmung auf dem Wasserbad abgedampft und die Wirkstoffe in den einzelnen Fraktionen danach gravimetrisch und papierchromatographisch bestimmt.

Zur Feststellung des verteilungschromatographischen Verhaltens der Schlafmittel wurden diese einzeln oder in Mischungen entwickelt.

5. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug bei Anwendung von Dichloräthan 2 ml/Min., bei Toluol 1,5 ml/Min., bei Cyclohexan 1 ml/Min. und bei Chloroform 2 ml/Min.

2. Untersuchungsergebnisse

α.) Feststellung der optimalen Bedingungen

Um das für eine Trennung geeignete Verhältnis der Menge an Zellulosepulver zum Volumen der stationären-karbonathaltigen Phase festzulegen, wurden Vorversuche an Säulen bei konstanter Entwicklung mit Dichloräthan mit den beiden unterschiedlichen Gruppen angehörenden Gliedern Valamin und Medomin durchgeführt. Da außerdem ein wesentlicher Einfluß der Natriumkarbonat-Konzentration in der stationären Phase auf die Wanderung der Barbitale ähnlich wie an der Kieselgel-Säule festgestellt wurde, mußten auch diese Bedingungen auf der Zellulose-Säule neu geprüft werden.

Die Auswertung der hierzu durchgeführten Voruntersuchungen

ergab, daß für die Trennung der Schlafmittelgruppen 12 g Zellulosepulver imprägniert mit 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung als optimal anzusehen sind.

Bei dieser Menge an Zellulosepulver ist das zur beginnenden Elution der Wirkstoffe notwendige Volumen an mobiler Phase nicht zu groß und damit für eine praktische Anwendung von Vorteil. Die stationäre-karbonathaltige Phase betrug somit 41,7 % des Gewichtes der Stützphase.

Die Kapazität des Zellulosepulvers für die stationäre Phase ist im Vergleich zu Kieselgel wesentlich geringer. Eine sehr gleichmäßige Ausbildung der stationären Phase an dem Zellulosepulver ist für den Ablauf des Verteilungseffektes unbedingt erforderlich. Die nachfolgende 12-stündige Klimatisierung des imprägnierten Zellulosepulvers in einer wassergesättigten Atmosphäre brachte keine Verbesserung des Trenneffektes. Es kann daher angenommen werden, daß schon durch die gewählte Imprägnierung allein eine gleichmäßig und ausreichende stationäre Phase vorhanden ist.

Die Konzentration des Natriumkarbonates in der stationären Phase wirkt sich auch bei der Zellulosesäule wesentlich auf den Beginn der Elution der Barbitale aus. Im Gegensatz zum Kieselgel lassen sich jedoch hierbei mit viel geringerer Molarität Trennungseffekte erzielen, was besonders günstig ist, da dadurch eine wesentliche pH-Verschiebung und ein Aussalzeffekt in der wäßrigen Phase vermieden werden können.

Eine Konzentration von 0,25m-Natriumkarbonat (5 ml) auf der Säule reicht aus, um eine Trennung von Valamin und Medomin zu erreichen. Bei Anwendung von 5 ml 0,5m-Natriumkarbonatlösung kann die Wanderungsgeschwindigkeit von Medomin weiter verzögert und der Trennungsabstand zu Valamin vergrößert werden. Die Elution des Medomins ist aber bei einer Entwicklung mit apolaren Lösungsmitteln derart verzögert, daß diese Konzentration für eine praktische Durchführung ausscheiden mußte. Für eine schnelle und quantitative Elution der Barbitale könnten natürlich zusätzlich sehr polare Laufmittel angewandt werden, doch müßte hierbei mit der Möglichkeit eines teilweisen Auswaschens des Natriumkarbonates gerechnet werden.

Aus diesen Gründen erschien es angebracht, die Trennung aller Schlafmittel mit einer gleichbleibenden stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung zu untersuchen.

β.) Trennung der Barbitale von den anderen Sedativa durch Entwicklung mit einem Lösungsmittel

Von den zu untersuchenden Wirkstoffen wurden je 10 mg an einer 12g-Zellulose-Säule, die mit 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung imprägniert war, mit Dichloräthan entwickelt und zu 5 ml aufgefangen.

Das Elutionsdiagramm Abb. 12 (s.Seite 74) zeigt die Elution der Wirkstoffe unter diesen Bedingungen.

Mit 45 ml Dichloräthan werden bereits alle barbitursäurefreien Schlafmittel eluiert, während die Wanderungsgeschwindigkeit der Barbitale in der dissoziierten Form auf Grund ihrer besseren Löslichkeit in der stationären Phase langsamer ist. Eine Trennung der beiden Schlafmittelgruppen ist hierbei möglich, doch ist der Elutionsabstand zwischen den beiden Gruppen noch recht gering.

Eine Ausnahme bei der Entwicklung zeigen Evipan und Prominal, die zusammen mit der Gruppe der Nichtbarbitale eluiert werden. Eine Erklärung dafür kann darin gesehen werden, daß diese Substanzen in der Keto-Form und nicht in der dissoziierten Form wandern. Außerdem weisen Evipan und Prominal von allen Barbitalen im Löslichkeitsverhalten die größte Ähnlichkeit mit den barbitursäurefreien Verbindungen auf. Durch das CH_3-Radikal am Stickstoff bei Evipan und Prominal werden die hydrophoben Eigenschaften erhöht, was zur Folge hat, daß mit diesem Laufmittel hohe R-Werte erzielt werden.

Die Wanderungsunterschiede der einzelnen Barbitale als Ergebnis ihrer Verteilung zwischen den einzelnen Phasen sind von der Verschiedenheit der am C-5 und am Stickstoff fixierten Molekülgruppen abhängig. Aus der Anwesenheit hydrophober Gruppen kann auf die Löslichkeit in der mobilen Phase geschlossen werden.

Bei der Entwicklung mit Dichloräthan werden unter den genannten Bedingungen Medomin von Phanodorm und Noctal und diese wieder von Luminal und Veronal getrennt. Die Elutionskurven dieser Stoffe zeigen kein gut ausgeprägtes Maximum, so daß zu ihrer Eluierung ein größeres Volumen an Dichloräthan notwendig ist.

Die Auftrennung der Schlafmittelgruppen mit Dichloräthan ist jedoch nur möglich, wenn die Barbitale (vor allem Medomin, Phanodorm und Noctal) in Mengen von 10 mg vorliegen. Bei Barbitalmengen von 30 mg erfolgt der Elutionsbeginn wesentlich früher.

Diese Erscheinung könnte auf die begrenzte Kapazität an Natriumkarbonat in der stationären Phase, die zur Überführung der Barbitale in die dissoziierte Form notwendig ist, zurückzuführen sein.

Stöchiometrische Berechnungen ergaben jedoch, daß die Menge an Natriumkarbonat ausreichen müßte, um die Barbitale in die dissoziierte Form zu überführen. Inwieweit diese theoretischen Voraussetzungen zutreffen, kann schwer entschieden werden. Da jedoch auch bei papierchromatographischen Untersuchungen größerer Substanzmengen von Barbitalen mit dem Laufmittel nach SEIFERT, dessen ammoniakalische Atmosphäre die Gewähr bietet, daß die Substanzen vollständig in die dissoziierte Form überführt werden, ebenso Rf-Erhöhungen festgestellt wurden, ist wahrscheinlich die folgende Erklärung zutreffend.

Das an dem Zellulosepulver fixierte Wasser ist zunächst nicht mit reinem Wasser vergleichbar. HANES und HORNER sprechen von einem Zellulose-Wasser-Komplex, zwischen dem und der mobilen Phase sich die Substanzen verteilen. Die Menge der stationären Phase ist im Verhältnis zur mobilen Phase auf der Säule wesentlich geringer. Es besteht die Möglichkeit, daß bei entsprechend vergrößerter Substanzmenge das Aufnahmevermögen der stationären Phase erschöpft ist, so daß eine Verschiebung in Richtung der mobilen Phase eintritt. Dieses hat dann eine schnellere Elution der Substanzen zur Folge, wobei es zu einer Überschneidung nebeneinander liegender Zonen kommen kann.

Die nächsten Untersuchungen sollten dazu führen, den R-Abstand zwischen der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa und den Barbitalen zu vergrößern, um eine Überschneidung der Gruppenzonen auch bei einer Belastung mit 30 mg Barbital völlig auszuschließen. Eine Möglichkeit zur Erreichung dieses Zieles war die Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Barbitale in der mobilen Phase durch Entwicklung mit stärker apolaren Lösungsmitteln.

γ.) Trennung der Barbitale von den anderen Sedativa durch Entwicklung mit zwei Lösungsmitteln

Bei der Auswahl des in Frage kommenden apolaren Lösungsmittels (s.Tab. 5), zur Erzielung einer sehr unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Schlafmittel, erschien Toluol am geeignetsten. Es war jedoch anzunehmen, daß bei einer Entwicklung mit diesem Lösungsmittel eine so starke Elutionsverzögerung der Barbitale auftritt, daß die Anwendung eines zweiten Laufmittels erforderlich sein würde.

Zur Prüfung der Eignung von Toluol wurden 12g-Zellulose-Säulen mit 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung als stationäre Phase hergestellt und je 10 mg Schlafmittel mit Toluol entwickelt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit aller barbitursäurefreien Substanzen war hierbei so groß, daß diese Wirkstoffe mit 60 ml Toluol eluiert wurden, während die Wanderung der Barbitale so stark zurückgedrängt war, daß mit 100 ml Toluol keine Elution erfolgte. Dadurch können alle barbitursäurefreien Schlafmittel mit völliger Sicherheit quantitativ von den Barbitalen (außer Evipan und Prominal) abgetrennt werden.

Ausnahmen bilden hierbei wiederum Evipan und Prominal. Diese Wirkstoffe können jedoch mit Hilfe der in Abschnitt (B.II.b.2.) neu ermittelten adsorptionschromatographischen Methoden von der Gruppe der Nichtbarbitale abgetrennt werden. Nach Auftrennung der barbitursäurefreien Sedativa die nachfolgend behandelt wird, fallen Evipan und Prominal mit Bromural und Persedon zusammen im Eluat an. Daraus kann Bromural durch Adsorption an saurem Aluminiumoxyd quantitativ abgetrennt werden.

Abb. 12

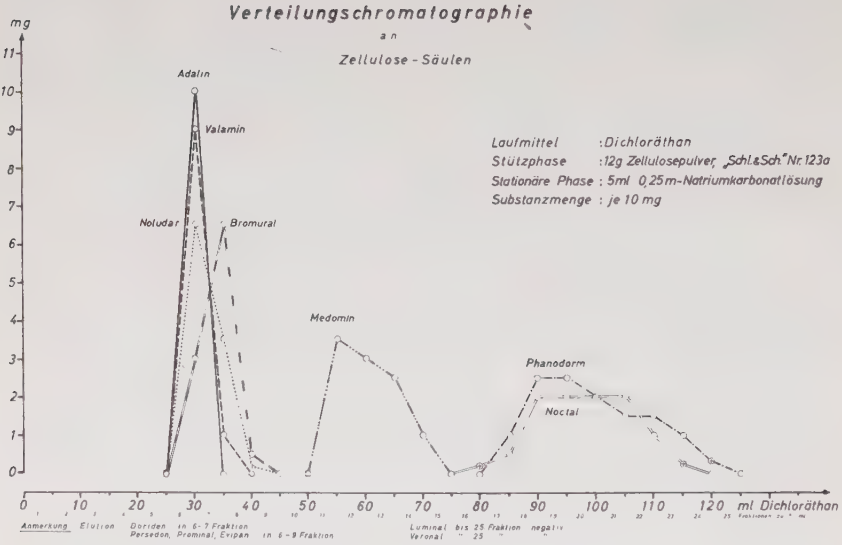
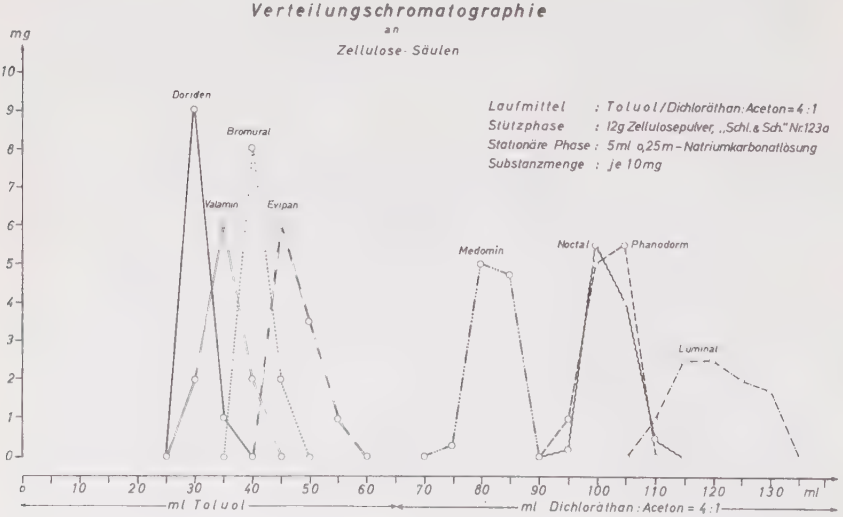

Verteilungschromatographie
an
Zellulose-Säulen
mg
Adalin
Valamin
Noludar
Bromural
Medomin
Phanodorm
Noctal
Laufmittel : Dichloräthan
Stützphase : 12g Zellulosepulver, „Schl.&Sch." Nr. 123a
Stationäre Phase : 5ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung
Substanzmenge : je 10 mg
ml Dichloräthan
Anmerkung Elution Doriden in 6-7 Fraktion
Persedon, Prominal, Evipan in 6-9 Fraktion
Luminal bis 25 Fraktion negativ
Veronal " 25 "

Abb. 13


Verteilungschromatographie
an
Zellulose-Säulen
mg
Doriden
Bromural
Valamin
Evipan
Medomin
Noctal
Phanodorm
Luminal
Laufmittel : Toluol/Dichloräthan: Aceton = 4 : 1
Stützphase : 12g Zellulosepulver, „Schl.& Sch." Nr. 123a
Stationäre Phase : 5ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung
Substanzmenge : je 10mg
ml Toluol
ml Dichloräthan : Aceton = 4 : 1

Um die Barbitale nach der Entwicklung mit Toluol aus der Säule zu eluieren, war ein zweites Laufmittel erforderlich. Eine anschließende Entwicklung mit einem Gemisch von Dichloräthan und Aceton im Verhältnis 4:1 ergab bei je 10 mg Wirkstoff eine Trennung des Medomin von Noctal und Phanodorm. Luminal wurde nachfolgend eluiert. Eine geringfügige Überschneidung der einzelnen Barbitalzonen ist hierbei nicht ganz zu vermeiden.

Die Abb. 13 zeigt die erhaltenen Elutionskurven der Schlafmittel unter den angeführten Bedingungen bei einer Entwicklung mit Toluol und anschließend daran mit Dichloräthan-Aceton (4:1).

Es galt nun noch zu klären, ob auch bei einer Entwicklung von größeren Barbitalmengen mit Toluol eine Abtrennung von den barbitursäurefreien Schlafmitteln möglich ist.

Zu diesem Zweck wurden je 30 mg Doriden, Bromural, Adalin, Valamin und Evipan mit 100 mg Barbitalen gemischt und mit Toluol entwickelt. Anschließend daran wurde zur Elution der Barbitale Chloroform angewandt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt und bestätigen, daß auch bei diesem hohen Barbitaleinsatz von 100 mg eine Trennung der barbitursäurefreien Substanzen von den Barbitalen gegeben ist.

Tab. 7

Entwicklung größerer Substanzmengen der Schlafmittel mit Toluol an 12 g Zellulosepulver mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung

Nr.	Frakt. ml	Lösungsmittel	Entwickelte und eluierte Substanzen				
			Bromural 30 mg	Doriden 30 mg	Evipan 30 mg	Adalin 30 mg	Valamin 30 mg
			Phanodorm 100 mg	Cyclopal 100 mg	Cyclopal 30 mg	Noctal 100 mg	Medomin 100 mg
1	50	Toluol	25 mg	30 mg	19 mg	29 mg	29,5 mg
2	10	Toluol	5 mg	-	8,5 mg	-	-
3	10	Toluol	-	-	2 mg	-	-
4	10	Toluol	-	±	±	-	-
5	10	Toluol	-	6 mg	-	-	-
6	10	Toluol	-	8 mg	-	-	-
7	10	Toluol	-	8 mg	-	-	-
8	150	Chloroform	98,8 mg	77,2 mg	29,5 mg	98,2 mg	100 mg

δ) Auftrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel

Nachdem eine sichere Abtrennung aller barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen an einer Säule durch die Entwicklung mit Toluol gelungen war, sollte untersucht werden, wie die barbitursäurefreie Gruppe weiter aufgetrennt werden könnte.

Da die Wanderungsgeschwindigkeit der barbitursäurefreien Wirkstoffe bei der Entwicklung mit Toluol an der Säule verhältnismäßig groß ist, waren Annahmen dahingehend gerechtfertigt, daß sich durch Zugabe von Cyclohexan zum Toluol unterschiedliche Verteilungsverhältnisse für diese Sedativa ergeben könnten.

Um geeignete Laufmittel für eine Trennung an der Säule orientierend zu ermitteln, wurden zuerst papierchromatographische Untersuchungen mit den barbitursäurefreien Schlafmitteln durchgeführt.

Hierzu wurden einem Laufmittel Toluol:Ammoniak (25 %) = 10:1 steigende Cyclohexanmengen zugegeben und 50 γ von den zu untersuchenden barbitursäurefreien Wirkstoffen damit aufsteigend entwickelt. Die Papiere wurden, um eine völlige Ausbildung der stationären Phase zu gewährleisten, 12 Stunden vor dem Einhängen in das entsprechende Laufmittel in einer wassergesättigten Atmosphäre klimatisiert. Die Detektion der Stoffe wurde mit den einschlägigen Reagenzien durchgeführt.

Nachstehend werden zunächst die unterschiedlichen Rf-Werte der barbitursäurefreien Sedativa bei Entwicklung mit Toluol: Ammoniak (25 %) = 10:1 in Gegenüberstellung zu Cyclohexan: Ammoniak (25 %) = 10:1 angeführt.

Toluol:Ammoniak (25 %) = 10:1	Doriden	Abasin	Nocturetten	Adalin
	0,9	0,82	0,82	0,8
	Valamin	Noludar	Persedon	Bromural
	0,74	0,7	0,4	0,4

Cyclohexan:Ammoniak (25 %) = 10:1	Doriden	Abasin	Nocturetten	Adalin
	0,6	0,43	0,43	0,4
	Valamin	Noludar	Persedon	Bromural
	0,19	0,15	0,05	0,05

Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß bei einer Erniedrigung der Polarität durch Zugabe von Cyclohexan die Wanderungsgeschwindigkeit der barbitursäurefreien Schlafmittel wesentlich verlangsamt wird. Bei beiden Laufmitteln erfolgt dabei innerhalb dieser Stoffgruppe eine teilweise Auftrennung der Sedativa.

Vor allem lassen sich die Ureide Adalin und Bromural mit dem System Toluol:Ammoniak (25 %) = 10:1 gut trennen.

Für die Detektion der Ureide hat sich eine Reagens-Kombination Silbernitrat-Kaliumdichromat-Natronlauge als sehr brauchbar erwiesen, da sie eine genügende Empfindlichkeit

aufweist. 10-20 γ Ureide können hiermit sichtbar gemacht werden. Zur Vermeidung von Schwanzbildungen und zur Ausbildung auswertbarer Flecken sind nicht mehr als 50 γ der Ureide aufzutragen.

Folgende Arbeitsvorschrift hat sich bewährt:
Zu 100 ml Aceton, die mindestens 20 Tropfen Wasser enthalten, werden 1 ml einer wäßrigen 70 %igen Silbernitratlösung zugesetzt. Durch diese Lösung werden die getrockneten Papiere langsam hindurchgezogen. Die so vorbehandelten Papiere werden dann mit einer 0,3 %igen Kaliumdichromatlösung übersprüht, bis die ganze Fläche deutlich und gleichmäßig rot gefärbt erscheint. Auf das noch feuchte Papier wird eine 0,5n-methanolische Natronlauge leicht aufgesprüht. Nach kurzer Zeit erscheinen auf schwach grün-gelb gefärbtem Untergrund die Ureide als deutlich rote Flecken.

Die Silberdichromatkomplexbildung ist jedoch nicht spezifisch, da die Klasse der Barbitale, Meprobamate und Sulfonamide, die GOEBEL bei Anwendung des Reagenzes untersuchte, ebenso angefärbt werden. Aus der Lage der Rf-Werte lassen sich jedoch Rückschlüsse auf den in Frage kommenden Wirkstoff ziehen.

Die Ureide können auch nach VIDIC (1959) papierchromatographisch bestimmt werden. Hierbei wird das apolare Lösungsmittel Benzin, benzolfrei, (Sdp. 60-80° C) verwendet, dem ein geringer Teil an Butanol zugesetzt wird. Infolge der leichten Flüchtigkeit der apolaren Komponente können die Rf-Werte hier aber leicht ansteigen. Die Detektion der Ureide erfolgt hierbei durch Chlor-Benzidin. Diese Anfärbung verlangt jedoch einige Erfahrung bezüglich der Einwirkungsdauer und der Konzentration des Chlorgases.

Zur Bestimmung der Ureide ist die Entwicklung mit Toluol: Ammoniak (25 %) = 10:1 und die Detektion mit Silbernitrat-Kaliumdichromat-Natronlauge in der praktischen Handhabung einfacher und wurde deshalb zum Nachweis der Ureide in den einzelnen Eluaten nach der säulenchromatographischen Entwicklung angewandt.

Nachdem durch diese Versuche die Verteilungsverhältnisse der barbitursäurefreien Schlafmittel bei Entwicklung mit den apolaren Lösungsmitteln erkannt waren, sollten diese Verhältnisse auf eine Zellulose-Säule übertragen und daran die Trennung der barbitursäurefreien Sedativa studiert werden.

Die barbitursäurefreien Schlafmittel wurden zu je 10 mg an einer 12g-Zellulose-Säule, die mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung imprägniert war, mit 50 ml Cyclohexan, anschließend daran mit 50 ml Cyclohexan :Toluol = 10:4 und mit Toluol zur Entwicklung gebracht. Wie die Elutionskurven von Abb. 14 zeigen, ist durch diese Aufeinanderfolge von Lösungsmitteln steigender Polarität eine Auftrennung der Gruppe der Nichtbarbitale möglich.

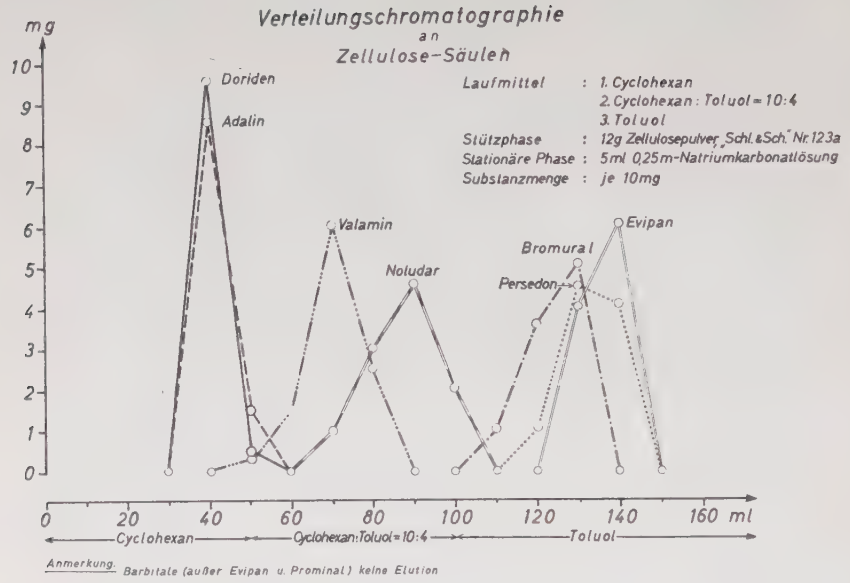
Mit Cyclohexan werden Doriden und Adalin von den anderen Sedativa auf der Säule abgetrennt und daraufhin können die restlichen barbitursäurefreien Schlafmittel und Evipan gemeinsam mit Toluol eluiert werden. Durch Zwischenschaltung einer Elution mit Cyclohexan-Toluol können außerdem Valamin und Noludar gesondert eluiert werden.

Anschließend wurden weitere Versuche unter denselben Bedingungen bei Entwicklung einiger Schlafmittel durchgeführt, um die ermittelten Resultate auch bei Anwendung größerer Substanzmengen zu überprüfen.

Die Entwicklung einiger Schlafmittel in Mengen zu je 30 mg wurde mit 60 ml Cyclohexan, anschließend daran mit 100 ml Toluol und nachfolgend mit Chloroform untersucht. Außerdem wurde 2-Methyl-2-n-propyl-1,3-propandioldicarbamat (Miltaun) mit in den Untersuchungsgang aufgenommen.

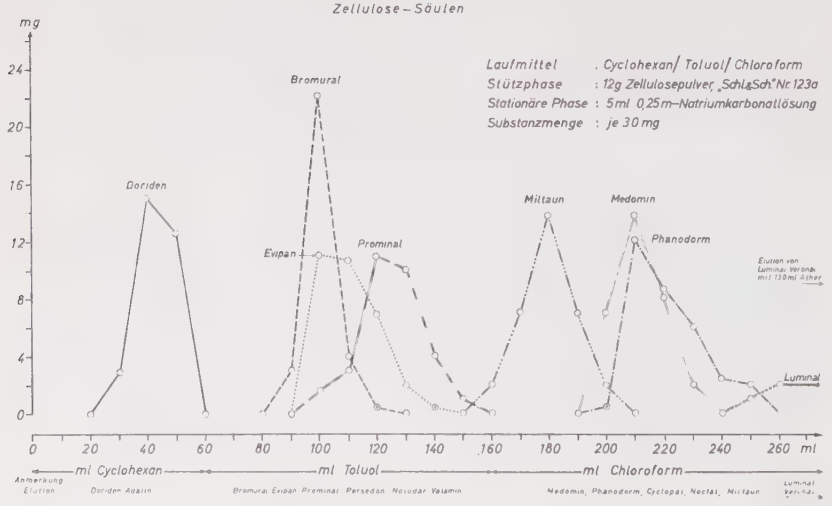
Die erhaltenen Elutionskurven sind in Abb. 15 aufgezeichnet und bestätigen erneut, daß sich an dieser Säule Doriden durch Entwicklung mit Cyclohexan von Bromural, Evipan und Prominal abtrennen lassen. Letztere Substanzen werden dann quantitativ mit Toluol eluiert (s.auch Tab. 7), wobei Miltaun und die übrigen Barbitale auf der Säule verbleiben und mit Chloroform entwickelt werden.

Abb. 14



Anmerkung: Barbitale (außer Evipan u. Prominal) keine Elution

Abb. 15



c) Trennung von Medomin, Cyclopal, Phanodorm und Noctal von Luminal und Veronal

Wie bei den obigen Versuchen festgestellt wurde und auch aus den Abb. 12, 13 und 15 zu ersehen ist, waren gewisse Ansätze für eine Abtrennung von Medomin und Phanodorm von Luminal und Veronal vorhanden.

Veronal und Luminal besitzen eine etwas geringere Löslichkeit in der organischen Phase als die anderen Barbitale, so daß sich eine verzögerte Wanderungsgeschwindigkeit für diese Substanzen ergibt. Der Elutionsabstand zwischen Phanodorm und Luminal war jedoch auf der Säule bei den durchgeführten Untersuchungen nicht so groß, daß eine quantitative Trennung mit Sicherheit erreicht war.

Um günstigere Trennungsbedingungen zu finden, wurden je 10 - 30 mg Phanodorm und Luminal an einer Zellulose-Säule mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung mit den verschiedensten organischen Lösungsmitteln und Kombinationen entwickelt.

Geeignete Bedingungen zur Trennung dieser beiden Wirkstoffe ergaben sich vor allem bei einer Entwicklung mit Chloroform oder Dichlormethan, wobei darauf geachtet wurde, daß das Lösungsmittelvolumen zur Elution von Phanodorm nicht zu groß war. Diese Verhältnisse entsprechen der Wanderung einer gut ausgebildeten Zone auf der Säule, die eine sichere Trennung von den nachfolgenden Wirkstoffen gewährleistet.

Die anschließend aufgestellte Versuchsreihe bei der Entwicklung von Phanodorm und Luminal mit Chloroform zeigte jedoch, daß die beginnende Elution von Luminal von seiner Konzentration auf der Säule abhängig ist. Von dieser Auswirkung einer zeitigeren Elution bei höherer Substanzkonzentration wurde schon vorhergehend berichtet.

Die Abb. 16 zeigt in diesem Zusammenhang die bei den Versuchen gewonnenen Elutionskurven von Phanodorm und Luminal verschiedener Konzentrationen bei einer Entwicklung mit Chloroform. Bei Luminal wurde nicht der gesamte Kurvenverlauf ermittelt, da die Kurve sehr flach verläuft und nur der

Elutions-Beginn dieses Wirkstoffes wesentlich ist.

Aus dem Elutionsdiagramm ist zu ersehen, daß eine Abtrennung von 10-30 mg Phanodorm bei Entwicklung mit Chloroform erreicht wird, wenn nur 10 mg Luminal als nachfolgende Zone zur Entwicklung kommen. Phanodorm wird mit 130 ml Chloroform quantitativ eluiert, während die Elution von 10 mg Luminal erst nach 150 ml beginnt.

Schwierigkeiten treten jedoch auf, wenn in der nachfolgenden Zone 30 mg Luminal, deren Elutions-Beginn schon nach 90 ml Chloroform einsetzt, entwickelt werden. Der Elutionsabstand zwischen Phanodorm und Luminal verringert sich dadurch, wobei jedoch hervorgehoben werden muß, daß immer zuerst das Phanodorm aus der Säule eluiert wird. Man kann somit nur von einer Verwaschung der Zonenränder sprechen, wobei die größere Konzentration an Luminal den ersteren Wirkstoff aus der Säule verdrängt.

Es sollten aber auch bei Entwicklung von 30 mg Luminal Bedingungen für eine sichere Abtrennung von Phanodorm (Medomin, Cyclopal, Noctal) für die forensische Praxis ermittelt werden. Eine Möglichkeit hierfür war die Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit von 30 mg Luminal durch die Zwischenschaltung einer Entwicklung mit Toluol.

Zu diesem Zweck wurden je 30 mg der zu untersuchenden Barbitale zuerst mit 60 ml Chloroform, dann mit 60 ml Toluol und nachfolgend mit 130 ml Äther an einer 12g-Zellulose-Säule mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung entwickelt.

Die Abb. 17 zeigt die erhaltenen Elutionskurven, woraus zu ersehen ist, daß durch diese Entwicklung mit den angeführten Lösungsmitteln eine quantitative und sichere Trennung von je 30 mg Phanodorm, Medomin, Cyclopal und Noctal von Luminal und Veronal erreicht wird.

Wichtig ist hierbei, daß die Aufgabe des Toluol auf die Säule nach Elution von 60 ml Chloroform erfolgt, da das Säulenvolumen bei der angewandten Säule noch ca. 25-30 ml Lösungsmittel (Chloroform) enthält, das gerade noch dafür aus-

Abb. 16

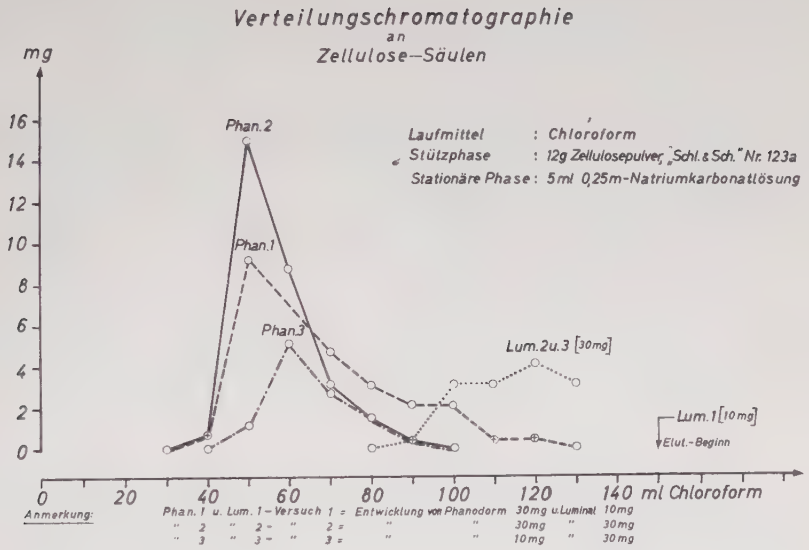
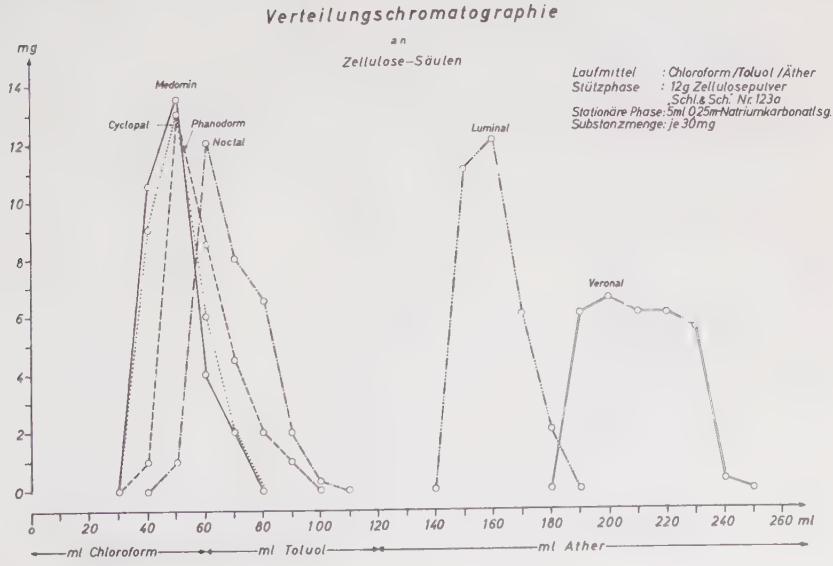

Verteilungschromatographie
an
Zellulose–Säulen
mg
Phan.2
Phan.1
Phan.3
Lum.2u.3 [30mg]
Lum.1 [10mg]
Elut.-Beginn
Laufmittel : Chloroform
Stützphase : 12g Zellulosepulver „Schl.&Sch." Nr. 123a
Stationäre Phase : 5ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung
0 20 40 60 80 100 120 140 ml Chloroform
Anmerkung:
Phan. 1 u. Lum. 1 – Versuch 1 = Entwicklung von Phanodorm 30mg u. Luminal 10mg
" 2 " 2 – " 2 = " " 30mg " 30mg
" 3 " 3 – " 3 = " " 10mg " 30mg

Abb. 17


Verteilungschromatographie
an
Zellulose–Säulen
mg
Medomin
Cyclopal
Phanodorm
Noctal
Luminal
Veronal
Laufmittel : Chloroform/Toluol/Äther
Stützphase : 12g Zellulosepulver „Schl.&Sch." Nr. 123a
Stationäre Phase: 5ml 0,25m-Natriumkarbonatlsg.
Substanzmenge: je 30mg
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 ml
ml Chloroform
ml Toluol
ml Äther

reicht, um (bis 90 ml) Phanodorm, Noctal, Cyclopal und Medomin aus der Säule zu eluieren. Mit dem nachlaufenden Toluol wird dann die Wanderungsgeschwindigkeit von Veronal und Luminal so verringert, daß eine Abtrennung erfolgt und diese Wirkstoffe aus der Säule dann mit Äther eluiert werden können.

Nur Dial zeigt eine gewisse Ausnahme, da es bei der Verteilung eine gewisse Mittelstellung zwischen Phanodorm und Luminal einnimmt. Geringe Spuren von Dial können bei dieser angeführten Auftrennung mit in der ersten Gruppe anfallen, während die Hauptmenge des Wirkstoffes mit Äther eluiert wird.

Durch die Anwendung von Chloroform, Toluol und Äther konnte somit die Barbitalgruppe auch bei Entwicklung größerer Substanzmengen in zwei Gruppen (Medomin, Cyclopal, Phanodorm, Noctal und Luminal, Veronal) sicher aufgetrennt werden.

3. Neues Verfahren der verteilungschromatographischen Auftrennung der Schlafmittelgruppen an Zellulose-Säulen

Aus den Ergebnissen, die bei den Verteilungschromatographischen Untersuchungen der Sedativa an Zellulosepulver ermittelt wurden, ergibt sich ein exakter und sicherer Trennungsgang zur quantitativen Gruppentrennung der therapeutisch wichtigsten Schlafmittel.

Die Trennung der Schlafmittelgruppen wird an einer 12g-Zellulose-Säule mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung durchgeführt. Durch fortlaufende und aufeinanderfolgende Entwicklung mit den ermittelten Lösungsmitteln, die in Tabelle 8 bei den entsprechenden Trennungen zusammengefaßt angeführt sind, werden die Schlafmittel an der Säule entwickelt und durch ihre unterschiedliche Verteilung aufgetrennt.

Bei den Untersuchungen gelang es mehrere verteilungschromatographische Verfahren, die für eine Auftrennung der Schlafmittelgruppen geeignet sind, zu ermitteln, die dann durch weitere Ausgestaltung zu einem sicheren und quantitativen Gruppentrennungsgang aller zu untersuchenden Schlafmittel führten.

In Tabelle 8 sind die ermittelten Einzeltrennungen zusam-

Tab. 8

Neue Verfahren zur Trennung der Schlafmittelgruppen; Angabe der Lösungsmittel und deren Volumina

Trennungen an 12 g Zellulosepulver mit einer stat. Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarb.Lsg.

A.

Nr.	Frakt.ml	Lösungsmittel	Substanz je 10 mg
1	50	Dichloräthan	Doriden, Bromural Valamin, Adalin, Persedon, Evipan, Noludar, Prominal,
2	30	"	Medomin
3	50	"	Phanodorm, Noctal,
4	130	Äther	Luminal, Veronal

B.

Nr.	Frakt.ml	Lösungsmittel	Substanz je 10 mg
1	65	Toluol	Doriden, Bromural, Valamin, Adalin, Persedon, Evipan, Noludar, Prominal,
2	25	Dichloräthan: Aceton=4:1	Medomin,
3	25	"	Phanodorm, Noctal, (Luminal ±)
4	130	Äther	Luminal, Veronal

C.

Nr.	Frakt.ml (10) mg (30)	Lösungsmittel	Substanz je 10-30 mg
1	50 60	Cyclohexan	Doriden, Adalin
2	50 60	Cyclohexan: Toluol=10:4	Valamin, Noludar
3	60 100	Toluol	Bromural, Persedon Evipan, Prominal

E

D.a

Nr.	Frakt.ml	Lösungsmittel	Substanz je 30 mg
1	100	Toluol	Doriden, Bromural, Valamin, Adalin, Persedon, Evipan, Noludar, Prominal,
2	90 (130+)	Chloroform	Medomin, Phanodorm, Cyclopal, Noctal, (Luminal, Dial ±)
3	130	Äther	Luminal, Dial, Veronal (+ bei 10 mg Luminal und Dial)

D.b

Nr	Frakt.ml	Lösungsmittel	Substanz je 30 mg
1(4)	60	Chloroform	Medomin, Cyclopal,
2(5)	60	Toluol	Phanodorm, Noctal, (Dial ±)
3(6)	130	Äther	Dial, Luminal, Veronal

mengefaßt. Sie können je nach den vorliegenden Bedingungen und den Erfordernissen, die an die Trennung der Schlafmittel gestellt werden, ausgeführt werden.

Bei der Durchführung der Trennung der Schlafmittelgruppen und der Wahl der Lösungsmittel, die für die Trennung der Schlafmittelgruppen zur Anwendung kommen müssen, sind die folgenden Punkte zu beachten. Alle Angaben beziehen sich auf eine Säule von 12 g Zellulosepulver mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung.

a.) Es ist erst einmal zweckmäßig zu wissen, welche Schlafmittel zur quantitativen Auftrennung gelangen sollen, damit nicht unbedingt alle angegebenen Lösungsmittel nach Tab. 8 (z.B. E oder D.a) bei Abwesenheit einer Gruppe zur Anwendung gelangen.

Für die später angeführte Dünnschichtchromatographie wurden einige Laufmittelsysteme ermittelt, mit denen sicher und schnell die Identifizierung der in Frage kommenden Schlafmittelgruppen (durch Rf-Wert-Unterschiede oder verschiedene Detektion zum Teil auch die der einzelnen Schlafmittel selbst) durchgeführt werden kann.

Steht ein größerer Zeitraum zur Ausführung der Trennung zur Verfügung, so können die Wirkstoffe auch mit den einschlägigen papierchromatographischen Methoden identifiziert werden. Daraus ergibt sich auch eine Schätzung der Mengenverhältnisse der einzelnen Stoffe.

Nach der Auswertung dieser Voruntersuchungen werden entsprechend den vorliegenden Substanzen die zu ihrer Entwicklung notwendigen Lösungsmittel nach Tab. 8 ausgewählt.

b.) Zur Abtrennung der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa sowie von Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen muß mit Toluol entwickelt werden. Es können hierbei Wirkstoffmengen von je 10-30 mg von den Schlafmitteln auf der Säule chromatographisch getrennt werden.

Eine Entwicklung mit Dichloräthan (A) zur Abtrennung der barbitursäurefreien Sedativa und zur teilweisen Auftrennung der einzelnen Barbitale ist nur dann möglich, wenn je 10 mg

der Barbitale vorliegen.

Nach der Entwicklung der barbitursäurefreien Schlafmittel mit Toluol ist für die Abtrennung von Medomin, Cyclopal, Noctal und Phanodorm von Luminal, Dial und Veronal entscheidend, ob Luminal oder Dial vorliegen und in welcher Konzentration diese beiden Wirkstoffe entwickelt werden müssen. Veronal kann bis zu einer Menge von 30 mg unberücksichtigt bleiben.

Nach der papierchromatographischen Identifizierung kann annähernd geschätzt werden, in welchen Substanzmengen Luminal und Dial vorliegen. Danach muß das Lösungsmittelvolumen von Chloroform, das hierbei zur Trennung angewandt wird, entsprechend festgesetzt werden.

Ist die Gruppe Phanodorm, Medomin, Cyclopal und Noctal, deren Glieder bis zu je 30 mg vorliegen können, von nur ca. 10 mg Luminal oder Dial abzutrennen, so wird mit 130 ml Chloroform und anschließend mit Äther entwickelt. Veronal kann ohne weiteres bis zu 30 mg chromatographiert werden (D.a^+).

Sollen jedoch Phanodorm, Medomin, Cyclopal und Noctal von 20-30 mg Luminal oder Dial abgetrennt werden, so muß zur sicheren quantitativen Abtrennung erst mit 60 ml Chloroform, dann mit 60 ml Toluol und anschließend mit Äther entwickelt werden (D.b). Ist hierbei nicht unbedingt eine quantitative Trennung (geringste Verwaschung der Zonenränder) erforderlich, so kann einfacher mit 90 ml Chloroform und anschließend nur mit Äther entwickelt werden (D.a).

Nachfolgend sollen die neu ermittelten verteilungschromatographischen Einzeltrennungen und der sich daraus ergebende Trennungsgang der Schlafmittelgruppen an einer Zellulosesäule kurz zusammenfassend angeführt werden.

Alle Trennungen erfolgen an einer 12g-Zellulose-Säule mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung.

1. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie Evipan und Prominal von allen übrigen Barbitalen und teilweise Auftrennung letzterer Gruppe durch Entwicklung mit Dichloräthan und einer Barbitalmenge von je 10 mg.

2. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen bei Entwicklung mit Toluol und nachfolgend mit Dichloräthan-Aceton (4:1) zur teilweisen Auftrennung von je 10 mg der Barbitale.

3. Auftrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel durch Entwicklung mit Cyclohexan zur Abtrennung von Doriden und Adalin, nachfolgende Entwicklung mit Cyclohexan:Toluol = 10:4 zur Abtrennung von Valamin und Noludar und dann mit Toluol zur Elution von Bromural, Persedon, Evipan und Prominal.

4. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen, die in Substanzmengen bis zu je 30 mg vorliegen können, durch Entwicklung mit Toluol und weitere Abtrennung von Medomin, Cyclopal, Phanodorm und Noctal von Luminal, Dial und Veronal durch Entwicklung mit Chloroform, (Toluol) und Äther.

5. Die Ergebnisse führten zu einem neuen Trennungsgang für alle Schlafmittelgruppen, wobei Substanzmengen bis zu 30 mg für die Wirkstoffe zu Grunde gelegt sind.

Zu 5. Zur Abtrennung der zu untersuchenden barbitursäurefreien Schlafmittel sowie von Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen wird mit 100 ml Toluol entwickelt.

Zur weiteren Abtrennung von Medomin, Cyclopal, Noctal und Phanodorm von Luminal, Dial und Veronal wird folgendermaßen verfahren:
Bei ca. 30 mg Luminal und Dial muß mit 60 ml Chloroform nachfolgend mit 60 ml Toluol zur Abtrennung von Medomin, Cyclopal, Noctal und Phanodorm entwickelt werden.
Ist keine absolute quantitative Trennung innerhalb der Barbitalgruppe bei je 30 mg Luminal und Dial erforderlich, so werden nach der ersteren Entwicklung mit Toluol 90 ml Chloroform angewandt.
Bei ca. 10 mg Luminal und Dial wird zur Abtrennung von Medomin, Cyclopal, Noctal und Phanodorm mit 130 ml Chloroform entwickelt.

Luminal, Veronal und Dial werden nach der Chloroform-Entwicklung mit Äther eluiert.

Zur weiteren Auftrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel wird das Lösungsmittel Toluol aus dem ersten Eluat auf dem Wasserbad in einem starken Luftzug verdampft und die im Rückstand befindlichen barbitursäurefreien Sedativa sowie Evipan und Prominal an einer zweiten 12g-Zellulose-Säule entwickelt. Mit 60 ml Cyclohexan werden Doriden und Adalin, nachfolgend mit 60 ml Cyclohexan:Toluol = 10:4 Valamin und Noludar und mit 100 ml Toluol (oder Chloroform) Bromural, Persedon, Evipan und Prominal eluiert.

Evipan und Prominal werden dann quantitativ von Bromural an einer sauren Aluminiumoxydsäule (s.Tabelle 4;1.) abgetrennt.

Der gesamte Trennungsgang kann auch nur an einer Säule durch aufeinanderfolgenden Wechsel der entsprechenden Lösungsmittel durchgeführt werden. Für die praktische Ausführung ist aber hinsichtlich der Abnahme der Eluate zur sicheren quantitativen Auftrennung a l l e r Schlafmittelgruppen bzw. einzelner Schlafmittel eine Entwicklung an zwei Säulen zweckmäßiger.

Die Säulen sind jedoch gleichartig zusammengesetzt, so daß die Art der Entwicklung je nach den vorliegenden Wirkstoffen durchgeführt werden kann. Eine Ausführung der Trennung an nur einer Säule ist vor allem dann angezeigt, wenn eine beschränkte Anzahl von Wirkstoffen zur chromatographischen Bestimmung gelangen sollen.

In den weitaus meisten Fällen der forensisch-toxikologischen Praxis wird man mit nur einer Säule die vorliegenden Wirkstoffe in die entsprechenden Gruppen bzw. die einzelnen Schlafmittel auftrennen können.

Die anschließende Übersicht Abb. 18 zeigt in systematischer Zusammenstellung die Auftrennung der Schlafmittelgruppen an der Zellulose-Säule.

Systematische Übersicht zur Trennung der Schlafmittelgruppen

an zwei bzw. einer 12 g-Zellulose-Säule

mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25 m-Natriumkarbonatlösung / Substanzmenge: je 30 mg

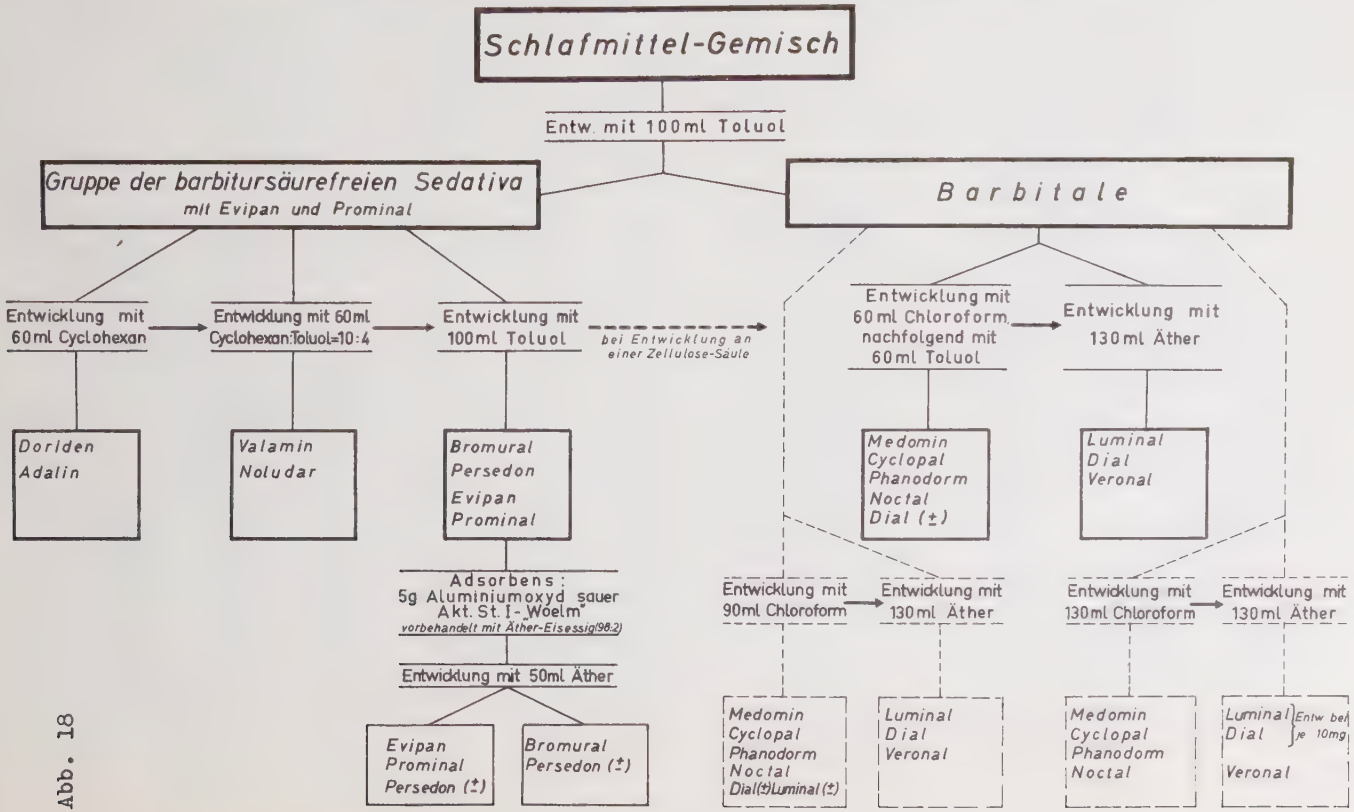


Abb. 18

D. SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNGEN DER ABBAUPRODUKTE DER SCHLAFMITTEL VON DEN UNVERÄNDERTEN SUBSTANZEN

a.) Einleitung

Nachdem die Schlafmittel auf verteilungschromatographischem Wege in verschiedene Gruppen aufgetrennt werden konnten, sollten noch, wegen der toxikologischen Bedeutung, eine quantitative Abtrennung der im menschlichen Harn auftretenden Umwandlungsprodukte der Barbitale von den unveränderten Substanzen an der Säule versucht werden.

Die nach der Körperpassage neben den unveränderten Substanzen auftretenden Abbauprodukte der Schlafmittel sind durch Molekülveränderungen entstanden, die einen wesentlichen Unterschied im chemischen Verhalten gegenüber den Reinbarbitalen zur Folge haben.

Beim Abbau der Schlafmittel wurde lange Zeit die Aufspaltung des Ringes als maßgebender Mechanismus betrachtet (NIELSEN; MADSEN; ASPELUND und SKOGLUND; RUHKOPF). Nach neueren Erkenntnissen ist die hydrolytische Ringspaltung für den Abbau nur von untergeordneter Bedeutung. Nach MAYNERT und DYKE geht der wichtigere Abbaumechanismus durch oxydative Veränderung an der C-5 Seitenkette vor sich, bei der Produkte guter Wasserlöslichkeit entstehen. Diese werden über die Niere mit dem Harn ausgeschieden, wo sie dann als reine Abbauprodukte oder als Paarungsprodukte mit Glukuronsäure vorliegen.

Neben den Reinbarbitalen sind vor allem die Abbauprodukte für die forensische Identifizierung von wesentlicher Bedeutung.

Der Nachweis der Umwandlungsprodukte geschieht in den meisten Fällen mit Hilfe der Papierchromatographie (SEIFERT; MOHRSCHULZ). Hervorgehoben sei hier besonders die Dissertation von GOEBEL, der am hiesigen Institut den Nachweis der Ausscheidungsprodukte durch seine Untersuchungen erweiterte und unter anderem eine papierchromatographische Trennung mit

dem Laufmittel Toluol:Butanol:Eisessig:Wasser = 9:2:4:5 entwickelte, das sich zur Auftrennung der Abbauprodukte als besonders geeignet erwies.

Aus letzterer Arbeit konnte der Hinweis entnommen werden, daß bei Ausschüttelungen von Ätherlösungen, die die Ausscheidungsprodukte von Schlafmitteln und die unveränderten Substanzen enthielten, mit Pufferlösungen von pH 7,8-8 eine Abtrennung der Abbauprodukte von den unveränderten Substanzen möglich ist. Der Nachweis dieser Trennung wurde papierchromatographisch geführt. Quantitative Ermittlungen bezüglich des Auftretens der Abbauprodukte sind deshalb sehr erschwert, weil sie nur in geringen Mengen im Harn anfallen.

DRESSLER, MÜLLER und SCHÖNFELD berichten auch über eine fraktionierte Extraktion der Substanzen aus Äther mit Pufferlösungen und konnten bei Verwendung eines Sörensen-Puffer von pH 7,4 die Ausscheidungsprodukte der Barbitale und stärker sauer reagierende Substanzen ausschütteln, während die Reinbarbitale im Äther zurückblieben.

Den Ergebnissen der Ausschüttelungen kann entnommen werden, daß den Abbauprodukten eine stärkere saure Reaktion als den Barbitalen zukommt. Der stärker saure Charakter und die bessere Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen führen im Vergleich zu den Barbitalen zu einem veränderten Verteilungsvorgang zwischen den Phasen.

Inwieweit die erwähnten Ausschüttelungen unter Ausnützung dieses chemischen Unterschiedes eine quantitative Trennung der Abbauprodukte von den Barbitalen zulassen, kann hier nicht beurteilt werden. Es ist jedoch ziemlich sicher, daß eine quantitative Abtrennung aller Abbauprodukte durch Ausschüttelungsvorgänge allein auf Grund der nahen Verwandtschaft zu den Barbitalen nicht durchführbar ist. Erfolgversprechend bieten sich die chromatographischen Trennungsmethoden an Säulen an.

Literaturangaben, die sich auf eine säulenchromatographische Trennung der Umwandlungsprodukte von den unveränderten Substanzen beziehen, konnten nicht aufgefunden werden. Die nachfolgenden Untersuchungen sollen daher als erster Beitrag

dazu dienen, die Möglichkeiten einer chromatographischen Trennung der Abbauprodukte von den Reinbarbitalen aufzuzeigen.

b.) Untersuchungsergebnisse

1. Extraktion und Reinigung

Bevor chromatographische Versuche durchgeführt werden konnten, mußte erst eine möglichst quantitative Extraktion der Umwandlungsprodukte aus dem Harn, der hauptsächlich als Untersuchungsmaterial für den Nachweis der Schlafmittel dient, durchgeführt werden.

Es galt ferner den Extrakt möglichst weitgehend von unerwünschten "Begleitstoffen" zu befreien, da gerade die chromatographischen Methoden an die Reinheit der Extrakte besondere Ansprüche stellen. Verunreinigungen können nämlich grundlegenden Einfluß auf den chromatographischen Ablauf ausüben, wobei es vor allem zu Schwanzbildungen durch Verzögerung der Gleichgewichtseinstellungen kommen kann.

Da in letzter Zeit vor allem chromatographische und spektrophotometrische Untersuchungen unter den Methoden der forensisch-toxikologischen Chemie überwiegen, ist es verständlich, daß laufend an einer Verfeinerung der bestehenden Extraktions- und Reinigungsverfahren gearbeitet wird.

Bei den nachfolgenden Versuchen wurden verschiedene Barbitale in therapeutischen Dosen an zuverlässige Versuchspersonen verabreicht, bei denen die Gewißheit bestand, daß keine anderen Arzneistoffe eingenommen worden waren. Die Harne wurden 12 - 16 Stunden nach Einnahme gewonnen. Zum Teil wurden auch Harne von Vergiftungsfällen, die im hiesigen Institut als Untersuchungsmaterial vorlagen, verwandt.

Um eine möglichst große Menge an Abbauprodukten für eine chromatographische Trennung ansetzen zu können, wurden meist fünf Harne der verschiedenen Versuchspersonen gesammelt und somit 1-2 Liter Harn der Extraktion unterworfen.

Für die Harnextraktion und für die anschließende Reinigung hat sich folgendes Arbeitsverfahren bewährt:

Der gesamte mit Schwefelsäure angesäuerte Harn (pH 2-3) wird auf ca. 100 ml auf dem Wasserbad eingedampft und mit Kieselgur und Natriumsulfat zur Trockne verrieben. Daraufhin wird mit ca. 500 ml Chloroform-Äther (60:80) angeschlemmt, dann drei Stunden mit Hilfe einer Schüttelmaschine extrahiert, das Lösungsmittel dann auf einer Filternutsche abgesaugt und mit reinem Chloroform-Äther nachgewaschen.

Von dem gesamten Chloroform-Ätherextrakt wird der größte Teil des Lösungsmittels durch Destillation zurückgewonnen, bis ca. 100 ml Extraktauszug verbleiben. Zu diesem werden 1,5 g Bleiacetat zugesetzt, eine Stunde auf dem Wasserbad schwach erwärmt und das Bleiacetat abfiltriert. Hierdurch wird der gelbe Extrakt wesentlich entfärbt. Eine Anwendung von 5 %iger Bleiacetatlösung erschien auf Grund der Wasserlöslichkeit der Abbauprodukte nicht zweckmäßig.

Der so behandelte Extraktauszug wird über Natriumsulfat getrocknet und nach Zugabe von 0,1 g Aktivkohle filtriert. Das Filter wird mit Äther gründlich nachgewaschen, anschließend daran der Extrakt und die Nachwaschung zusammen im Luftstrom eingedampft.

Der verbliebene Rückstand wird in 5-10 ml Äther aufgenommen und auf eine vorbereitete Kieselgelsäule zur weiteren Reinigung aufgebracht. Das mit Äther gefüllte Rohr wird schichtweise mit 5 g Kieselgel (0,2-0,5 mm), nachfolgend mit 5 g Kieselgel (0,2-0,5 mm) verrieben mit 500 mg Aktivkohle und zuletzt mit 5 g Kieselgel (0,2-0,5 mm) beschickt.

Nach Einfließen der ätherischen Substanzlösung wird die Säule mit ca. 200 ml Äther entwickelt. Das Kieselgel färbt sich oben stark bräunlich, und sobald das untere Kieselgel diesen Farbton annimmt, wird nicht weiter eluiert. Da festgestellt wurde, daß einige Abbauprodukte eine langsamere Wanderung aufweisen, darf die Äthermenge nicht zu knapp bemessen werden. Das erhaltene Eluat erscheint fast farblos; bei völligem Abdampfen des Lösungsmittels sind jedoch noch geringste Verunreinigungen festzustellen.

Der allergrößte Teil der harnpflichtigen Bestandteile, die bei einer sauren Extraktion mit dem organischen Lösungs-

mittel erfaßt werden, konnte aber durch diese Arbeitsweise an Kieselgur, Aktivkohle und Kieselgel adsorbiert werden.

Bei Aufarbeitung eines Sammel-Harnes, der bei Einnahme von 5 Tabletten Phanodorm (0,2) gewonnen wurde, betrug der Rückstand des Extraktes vor Aufgabe auf die Kieselgel-Säule im Durchschnitt 300 mg, nach der Reinigung durch die Säule 120-80 mg.

Nimmt man an, daß ein Sammelharn nach Einnahme einer Tablette Phanodorm (0,2) für ca. 20 papierchromatographische Bestimmungen zu etwa 100 γ ausreichen würde (geschätzt nach Laboratoriums-Auswertungen), so müßten bei einem Extrakt nach 5 Tabletten Phanodorm ca. 10 mg des Barbitals mit Abbauprodukten anfallen. Das ca. achtfache würde somit noch als Verunreinigung vorliegen. Hierbei ist die Menge an Abbauprodukten und unveränderter Substanz nur sehr angenähert geschätzt und zu dem obigen Rückstand nach der Reinigung in Vergleich gesetzt.

Genaue quantitative Verhältnisse lassen sich deshalb schwer ermitteln, da einmal individuelle Schwankungen im Abbau gegeben sind und da weder die Extraktion noch die Reinigung ausreichend vollständig verlaufen. Man kann jedoch von der wahrscheinlichen Annahme ausgehen, daß nach 5 Tabletten Phanodorm (0,2) ca. 10 mg unveränderte Substanz und ganz angenähert 20-25 mg Abbauprodukte ausgeschieden werden.

Da die absoluten Mengen der Abbauprodukte aus dem Harn nur gering sind, und daher große Mengen von Harn zu ihrer Gewinnung aufgearbeitet werden müssen, waren bei den nachfolgenden Trennungsversuchen infolge der noch unvollkommenen Reinigung quantitative Verhältnisse zwischen der Menge an Abbauprodukten und der Menge an unveränderter Substanz kaum zu erfassen. Es wurden daher vor allem Bedingungen für die Trennung der Umwandlungsprodukte von den Reinbarbitalen qualitativ untersucht und ausgewertet.

2. Untersuchungen zur Abtrennung der Abbauprodukte der Schlafmittel von den unveränderten Substanzen an Zellulose-Säulen

Die Möglichkeit einer chromatographischen Trennung der Abbauprodukte von den Reinbarbitalen war durch die Erkenntnis der stärker sauren Reaktion und der guten Wasserlöslichkeit der Abbauprodukte gegenüber den Barbitalen gegeben.

Diese beiden Eigenschaften unterscheiden sich im besonderen Maße von denen der unveränderten Substanzen und wurden durch die eingangs erwähnten Ausschüttelungsmethoden bewiesen. Auch bei der Betrachtung von Papierchromatogrammen dieser Substanzen nach dem Verfahren nach SEIFERT oder GOEBEL kann erkannt werden, daß den Abbauprodukten gegenüber den Barbitalen eine wesentlich geringere Wanderungsgeschwindigkeit, resultierend aus der Verteilung in den Phasen, zukommt.

Für die Versuche zur Abtrennung der Abbauprodukte wurde folgende Methode angewandt:

Die nach dem Reinigungsverfahren erhaltene Extraktlösung wurde zuerst papierchromatographisch mit dem Laufmittel nach GOEBEL identifiziert und danach festgelegt, welche Abbauprodukte von dem entsprechenden Barbitalderivat vorhanden waren. Es handelte sich hierbei vor allem um die Hauptabbauprodukte von Phanodorm (P_2 - Rf=0,30, P_3 - Rf=0,46) und um die unveränderte Substanz (P - Rf=0,87).

Die Extraktlösung wurde in drei gleiche Teile aufgeteilt und das Lösungsmittel verdampft. Die erhaltenen Rückstände wurden in wenig Äther gelöst und auf 12g-Zellulosesäulen, die mit stationären Phasen verschiedener pH-Abstufungen imprägniert waren, aufgebracht und mit Äther entwickelt. Aus den erhaltenen Eluaten wurde das Lösungsmittel verdampft und die eluierte Substanz papierchromatographisch identifiziert. Zum Vergleich wurde auf das Papierchromatogramm als Testlösung etwas von der gereinigten Extraktlösung mit aufgetragen. Mittels dieser qualitativen Untersuchung konnte festgestellt werden, unter welchen Bedingungen eine Trennung der Abbauprodukte von den Barbitalen möglich ist.

Die bei diesen Versuchen erhaltenen Resultate sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tab. 9

Verteilungschromatographische Versuche zur Trennung der Barbital-Abbauprodukte von den unveränderten Substanzen an einer 12g-Zellulose-Säule mit unterschiedlicher stationärer Phase bei Entwicklung mit Äther

		1.	2.	3.	4.
Nr.	Frak. ml	Phanodorm stat. Ph. 5 ml Sör. Puf. pH 7,8	Phanodorm stat. Ph. 5 ml 0,25m-$NaHCO_3$ pH 8	Noctal stat.Ph. 5 ml 0,25m-$NaHCO_3$ pH 8	Phanodorm stat. Ph. 5 ml 0,25m-Na_2CO_3 pH 10,8
1	10	-	-	-	-
2	10	-	-	-	-
3	10	Ph	Ph	N,N4	-
4	10	Ph,P3,(P2)	Ph,(P3)	N4(N3)	Ph
5	10	P3, P2	P3	(N3)	Ph
6	10	(P3) P2	P3	N3	Ph
7	10	P2	P3	N3	-
8	10	-	P3	N3	-
9	10	-	P3	N3	-
10	10	-	-	N3	-
11	10	-	-	-	-
12	10	-	-	-	-
13	100 70 % Alkohol	-	P2	(N2!)	P2, P3

Aus der Zusammenstellung ist ersichtlich, daß durch Veränderungen des pH der stationären Phase zum stärker alkalischen Gebiet hin sich Trennungsbedingungen zwischen unverän-

dertem Barbital und Abbauprodukten verwirklichen lassen. Außerdem scheinen Aussichten zu bestehen, daß an einer Zellulose-Säule mit einer bikarbonathaltigen-stationären Phase Auftrennungen innerhalb der Gruppe der Abbauprodukte vorgenommen werden können.

Eine sichere und quantitative Trennung der Abbauprodukte von den Barbitalen ist an einer 12g-Zellulose-Säule, die mit 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung imprägniert ist, durchführbar (Tab. 9, Vers. 4). Diese Trennung gibt auch Aufschluß darüber, wann eine Elution der Abbauprodukte bei Auftrennung der Schlafmittelgruppen an der verwendeten Zellulosesäule erfolgen würde. Bei der ausgearbeiteten Schlafmittelgruppen-Trennung erfolgt die letzte Elution von Luminal und Veronal mit Äther; es würden dann immer noch die Abbauprodukte auf der Säule verbleiben, die dann eluiert werden müßten. Auf alle Abbauprodukte kann dies aber vermutlich nicht bezogen werden, da einige von ihnen in ihren Verteilungsverhältnissen dem Veronal ähneln.

Eine Schwierigkeit bietet jedoch die nachfolgende Elution der Abbauprodukte, deren Wanderungsgeschwindigkeit auf der Säule so stark verzögert ist, daß sie nur durch Anwendung sehr polarer Lösungsmittel aus der Säule eluiert werden können. Eine Anwendung von Aceton oder absolutem Äthanol, die auch schon Teile der stationären Phase auszuwaschen vermögen, brachten nicht den erwünschten Erfolg. Nur mit 100 ml 70 %igem Äthanol konnte eine Elution der Abbauprodukte erreicht werden, wobei aber das Natriumkarbonat der stationären Phase teils auch Verunreinigungen mit eluiert wurden.

Inwieweit die Abbauprodukte aus diesem Eluat wegen ihrer guten Wasserlöslichkeit quantitativ wieder zurückgewonnen werden können, kann hierbei nicht ohne weiteres entschieden werden. Eine Möglichkeit besteht jedoch darin, daß die Eluate zur Trockne eingedampft und mit wenig Wasser aufgenommen werden. Nach Ansäuern auf pH 2-3 mit Schwefelsäure können dann die Abbauprodukte mit einem großen Anteil an Äther ausgeschüttelt werden.

Tab. 10 Verteilungschromatographische Versuche zur Trennung der Abbauprodukte von den unveränderten Substanzen

Nr.	Frakt. ml	5. Phanodorm 12 g Zellulose-pulver stat.Ph.:5ml 0,25m-$NaHCO_3$-Lsg. pH-8 Entw.:Chloroform	6. Phanodorm 12 g Zellulose-pulver stat.Ph.:5ml 0,25m-$NaHCO_3$-Lsg. pH-8 Entw.:Chloroform (alkoholfrei)	7. Medomin 12 g Zellulose-pulver stat.Ph.:5ml 0,25m-$NaHCO_3$-Lsg. pH 8 Entw.:Toluol-Butanol-Wasser (90:10:10)	8. Phanodorm 12 g Zellulose-pulver stat.Ph.:5ml H_2O Entw.:Toluol	9. Phanodorm 20 g Kieselgel stat.Ph.:15ml H_2O Entw.: Toluol
1	10	-	-	-	-	-
2	10	-	-	-	-	-
3	10	+ Ph, -	+ Ph, -	+ M, -	+ Ph,-	+ Ph,-
4	10	+ Ph, -	+ Ph, -	+ M, -	+ Ph,-	+ Ph,-
5	10	+ P-3	-	+ M, -	+ Ph,-	+ Ph,-
6	10	+ P-3	+ P-3	+ M, -	+ Ph,-	+ Ph,-
7	10	+ P-3	+ P-3	-	-	+ Ph,-
8	10	+ P-3	+ P-3	-	-	+ Ph,-
9	10	+ P-3	+ P-3	-	-	-
10	10	+ P-3	+ P-3	-	-	-
11	10	+(P-3)	+ P-3	-	-	-
12	Alkohol 50 70%	+ P-2	+(P-3),+P-2	+ M_1	+ P-3,+ P-2	+ P-3,+P-2

Anm.: Ph=Phanodorm (unveränderte Substanz)
P-3 = Phanodorm-Abbauprodukte
P-2

Nach dieser Versuchsreihe galt es noch zu klären, ob die Wanderungsgeschwindigkeit der Abbauprodukte durch Anwendung weniger polarer Lösungsmittel verändert werden kann.

Die Tabelle 10, (Versuch 5. 6. 7.) zeigt die Ergebnisse bei Entwicklung mit Chloroform und mit Toluol:Butanol:Wasser = 90:10:10 an einer Zellulose-Säule mit einer stationären natriumbikarbonathaltigen Phase. Es ergeben sich hierbei ebenfalls geeignete Trennungsbedingungen. Das Problem der Elution von P-2 ist auch hier in Betracht zu ziehen.

Es war auch naheliegend, in erster Linie die bessere Wasserlöslichkeit der Abbauprodukte bei der Verteilung zwischen den Phasen zu berücksichtigen und unter Anwendung eines sehr apolaren Lösungsmittels eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit zu erreichen.

Die Versuche 8 und 9 in Tab. 10 zeigen, daß an einer Zellulose- und Kieselgelsäule, die nur mit einer wäßrigen Phase imprägniert ist, bei Entwicklung mit Toluol gute Bedingungen für die Trennung der unveränderten Substanzen von den Abbauprodukten gegeben sind.

Die Untersuchungen bestätigen, daß mehrere Möglichkeiten für die Trennung der Abbauprodukte von der unveränderten Substanz für Phanodorm ermittelt werden konnten und daß daraus in weiterer Folge angenommen werden kann, daß noch andere geeignete Trennungs-Bedingungen zur Trennung der Abbauprodukte von den unveränderten Substanzen auch für die anderen Barbitale erschlossen werden könnten.

Außerdem erscheint es wahrscheinlich, daß bei geeigneter Länge und Zusammensetzung der Säule durch Wechsel der Lösungsmittel - beginnend mit sehr apolaren Lösungsmitteln - eine quantitative Abtrennung der unveränderten Substanzen und gleichzeitig eine Auftrennung der einzelnen Abbauprodukte ermittelt werden könnten.

Zur Erzielung quantitativer Trennungen wäre es ferner erforderlich, die Extraktion und Reinigung bei Aufarbeitung großer Mengen an Untersuchungsmaterial noch weiter zu verfeinern.

E. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE ZUR TRENNUNG DER SCHLAFMITTELGRUPPEN

a.) Einleitung

Der von STAHL entwickelten Dünnschichtchromatographie kommt große Bedeutung für die qualitative Mikroanalyse zu.

Als Adsorptionsmittel dient hier eine auf Glasplatten ausgestrichene und getrocknete Kieselgelschicht. Der Übergang auf sogenannte "offene Säulen" hat unter anderem den Vorteil geringeren Materialbedarfs, der sehr kurzen Zeitdauer einer Trennung und vor allem, da das Adsorbens anorganischer Natur ist, kann die Sichtbarmachung mit aggressiveren Reagenzien durchgeführt werden.

Eine Anwendung der Dünnschichtchromatographie auf den qualitativen Nachweis der Schlafmittel ist bis jetzt nicht bekannt geworden.

Um die erarbeitete Gruppentrennung der Schlafmittel auf der Säule sicher und schnell durchführen zu können, ergab sich die Notwendigkeit einer vorausgehenden qualitativen Bestimmung.

Diese ist mit Hilfe der Papierchromatographie in jedem Fall möglich, doch ist nach dem am meisten angewandten Verfahren nach SEIFERT eine Auswertung der Ergebnisse erst frühestens nach etwa 8 Stunden gegeben.

Um diese Zeitdauer herabzusetzen und schnell einen qualitativen Überblick über die in Frage kommenden Substanzen zu erhalten, wurde die Dünnschichtchromatographie auf ihre Anwendbarkeit für den genannten Zweck überprüft.

Vor allem sollte mit dieser Methode die Möglichkeit geschaffen werden, eine Art qualitative Gruppentrennung durchzuführen, die anzeigt, ob eine Substanz der Gruppe der barbitursäurefreien Schlafmittel oder der Barbital-Gruppe vorliegt. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob mit Hilfe von Detektionsverfahren oder Rf-Wert-Unterschieden, die in Frage kommenden Substanzen weiter identifiziert werden können.

b.) Praktische Untersuchungen

1. Herstellung der Kieselgelplatten

30 g Kieselgel-G-"Merck" für die Dünnschichtchromatographie wurden mit 60 ml Wasser, das in kleinen Anteilen zugesetzt wurde, gleichförmig angerieben. Dieser Vorgang muß in ca. 2 Minuten abgeschlossen sein, da sonst das Kieselgel infolge seines Gipsanteiles abbindet. Nach dem gleichförmigen Aufstreichen mit der Desaga-Apparatur auf die Glasplatten, wurden diese bei 110° C eine Stunde im Trockenschrank getrocknet und im Exsikkator zur Verwendung bereitgehalten.

Aus äthanolischen Lösungen wurden je 20 γ der zu untersuchenden Substanzen im Abstand von 1 cm auf Startpunkte, die vom unteren Plattenrand in einer gedachten Startlinie in einer Höhe von 1,5 cm markiert waren, aufgetragen.

Die Frontlinie wurde in 10 cm Entfernung von den Startpunkten am Rande markiert. Diese Festlegung der Fronthöhe wurde von STAHL angewandt und auch bei den folgenden Versuchen beibehalten. Inwieweit es möglich ist und für eine Trennung angebracht erscheint, die Fronthöhe noch zu vergrößern, müßte jeweils ermittelt werden.

2. Detektion der Substanzen

Durch Vorversuche wurden die Bedingungen für eine Detektion der zur Untersuchung gelangenden Substanzen geprüft. Dabei wurde auf die Erkenntnisse der Sichtbarmachung der Schlafmittel bei der Papierchromatographie zurückgegriffen.

Es wurden Platten, wie oben beschrieben, vorbereitet, mit verschiedenen Lösungsmitteln chromatographiert und dann die Detektion durch Anwendung nachfolgender Reagenzien untersucht.

α. Quecksilber-I-nitrat

Die nach dem Chromatographieren etwa 30 Minuten bei 80° C getrockneten Platten wurden mit einer 1 %igen wäßrigen Lösung von Quecksilber-I-nitrat unter dem Abzug leicht übersprüht.

Es erscheinen schwach graue Flecken bei den Barbitalen sowie bei Doriden und Valamin auf fleckig grauem Grund. Bei weiterem stärkerem Aufsprühen wird die Sichtbarmachung deutlicher, die Barbitale, Doriden und Valamin treten dann als trocken erscheinende weiße bis schwach graue Flecken auf, die sich von der dunkleren feuchten Umgebung abheben.

Nach diesen Untersuchungen scheinen die Substanzflecken eine wasserabstoßende Eigenschaft zu haben. Um diese zu beweisen, wurde eine wäßrige Farbstofflösung von 0,1 %igem Bromthymolblau aufgesprüht. Es zeigte sich, daß die wäßrige Farbstofflösung an den Stellen der Substanzflecken nicht aufgesaugt wurde. Die Flecken blieben weiß, während der Plattengrund eine gelbe (pH 5-6) Färbung zeigte.

Diese wasserabstoßende Eigenschaft ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Wasseraufnahme durch die Adsorption der schwer wasserlöslichen Barbitale an das Kieselgel gehindert wird, so daß das Reagens nur oberflächlich einwirken kann. Es handelt sich hierbei also nicht in erster Linie um eine Komplexbildung, die Substanzen heben sich vielmehr durch den optischen Unterschied hervor.

β. Kobalt-II-nitrat

Die entwickelten Platten wurden mit einer 2 %igen Lösung von $Co(NO_3)_2$ in wasserfreiem Methanol besprüht und sofort unter dem Föhn getrocknet. Anschließend daran wurde eine Lösung von Lithiumhydroxyd (0,5 g in 100 ml Methanol) aufgesprüht.

Es bilden sich bei den Barbitalen blaue Flecken auf weißem Grund. Doriden und Persedon werden hierbei (20 γ) nur wenig empfindlich angezeigt und sind schlecht sichtbar.

γ. Silbernitrat-Kaliumdichromat-Natronlauge

Dieses Reagens ist von GOEBEL auf seine Eignung zur Sichtbarmachung der Barbitale überprüft worden und in vorliegender Arbeit zur Detektion der Ureide bei der papierchromatographischen Identifizierung angewandt worden.

Es galt dieses brauchbare Reagens auch auf seine Anwendbarkeit für die Dünnschichtchromatographie zu überprüfen.

Zu 50 ml Aceton, die 2 ml Wasser enthielten, wurden 25 Tropfen einer gesättigten Silbernitratlösung zugesetzt. Diese acetonische Lösung wurde stark auf die zu untersuchenden Platten aufgesprüht und unter dem Föhn abgetrocknet. Die so vorbehandelten Platten wurden mit einer wäßrigen 0,3 %igen Kalidichromatlösung zweimal übersprüht, wobei nach jedem Aufsprühen unter dem Föhn abgetrocknet wurde.

Es ist darauf zu achten, daß die Platte in ihrer ganzen Fläche gleichmäßig rot erscheint. Auf diese wird anschließend eine 2 %ige methanolische Natronlauge aufgesprüht. Der rötliche Grundton entfärbt sich hierbei, während die Barbitale und Ureide als rote Flecken deutlich sichtbar bleiben. Valamin erscheint als grünlicher Fleck. Bei Doriden, Persedon, Evipan und Prominal ist die Empfindlichkeit nicht ausreichend, so daß diese nicht eindeutig sichtbar sind.

δ. Um Persedon auf der Platte zu identifizieren, wird diese mit einer 2 %igen methanolischen Natronlauge besprüht und die Fluoreszenz des Persedon unter der UV-Lampe markiert.

Noludar kann auf der Platte sichtbar gemacht werden, indem man eine 2 %ige Lösung von m-Dinitrobenzol in Methanol und eine 15 %ige wäßrige KOH-Lösung aufsprüht. Nach anschließendem Trocknen unter dem Föhn erscheint ein violetter Fleck.

Aus der Tabelle 11 geht hervor, daß bei allen zur Untersuchung gelangenden Substanzen eine Detektion auf der Platte möglich ist.

Sollen mehrere Detektionsverfahren zur Identifizierung einer Substanz notwendig sein, so ist dieses auch auf der Platte möglich. Hierzu wird die Untersuchungslösung auf mehrere genügend entfernte Startpunkte aufgetragen und chromatographiert. Zur Detektion werden die Flecken der Untersuchungssubstanz nacheinander angesprüht, indem immer entsprechende Teile der Platte abgedeckt werden. Durch dieses Vorgehen ist es möglich, die Substanz spezifisch oder mindestens ihre Gruppenzugehörigkeit zu identifizieren.

Tab. 11 Farbreaktionen der Barbitale und barbitursäurefreien Schlafmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Substanz	Angewandte Reagenzien				
	Hg-I-nitrat (α)	Co-II-nitrat (β)	Ag-I-nitrat Ka-dichromat NaOH(γ)	NaOH UV-Licht (δ)	KOH, Dinitrobenzol
Evipan	+ weiß-hellgrau	+ blau	(+) rot	-	-
Prominal	+ weiß-hellgrau	+ blau	(+) rot	-	-
Medomin	+ weiß-hellgrau	+ blau	+ rot	-	-
Cyclopal	+ weiß-hellgrau	+ blau	+ rot	-	-
Noctal	+ weiß-hellgrau	+ blau	+ rot	-	-
Phanodorm	+ weiß-hellgrau	+ blau	+ rot	-	-
Veronal	+ weiß-hellgrau	+ blau	+ rot	-	-
Luminal	+ weiß-hellgrau	+ blau	+ rot	-	-
Doriden	+ weiß-hellgrau	(+) blau	(+) rot	-	-
Valamin	+ grau	-	+ grau-grün	-	-
Persedon	-	(+) blau	(+) rot	+ Fluoreszenz	-
Noludar	-	-	-	-	+ Violett
Adalin	-	-	+ rot	-	-
Bromural	-	-	+ rot	-	-
Nocturetten	-	-	+ rot	-	-

Anmerkung: + deutlich positiv
(+) zu schwache Empfindlichkeit (bei 20 γ)

α. trockene, weiß-hellgraue Flecken auf dunkelgrauem, feuchtem Untergrund
β. blaue Flecken auf weißem Untergrund
γ. rote Flecken auf hellgrauem Untergrund

3. Trennungsverfahren für die Schlafmittelgruppen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Nachdem die Detektion der Wirkstoffe sichergestellt war, wurden verschiedene Lösungsmittelkombinationen auf ihre Verwendbarkeit für eine Trennung der Barbitale von den barbitursäurefreien Schlafmitteln untersucht. Es war das Ziel eine Möglichkeit zu schaffen, die Gruppen als solche durch ausreichende Rf-Differenzen aufzutrennen.

Die Dünnschichtchromatographie beruht auf der Tatsache, daß feste Stoffe, hier das Kieselgel mit großer innerer Oberfläche, gelöste Stoffe mehr oder weniger fest in ihren Kapillaren binden können. Dabei handelt es sich um keine Bindung im chemischen Sinne, sondern um reine Adsorption, die dadurch gekennzeichnet ist, daß mit geeigneten Lösungsmitteln das adsorbierte Molekül vom Träger unverändert wieder abgelöst werden kann.

Zur chromatographischen Entwicklung wurden die vorbereiteten Platten senkrecht in ein dicht abgeschlossenes Gefäß gebracht, auf dessen Boden sich das Lösungsmittelgemisch befand und aufsteigend entwickelt. An den Wandungen des Gefäßes wurden in das Lösungsmittel eintauchende Filtrierpapier-Streifen angebracht, damit eine genügende Kammersättigung erreicht wird. Die Kammersättigung erforderte bei allen Versuchen ca. 10 Minuten; die Entwicklungszeit betrug ca. 10 Minuten.

Soweit es sich bei den anschließenden Versuchen um zweiphasige Lösungsmittel handelt, wurde so verfahren, daß die Lösungsmittel mit dem angegebenen Teil an wäßriger Phase im Scheidetrichter gut durchgeschüttelt, der wäßrige Anteil abgetrennt und mit dem wassergesättigtem Lösungsmittel entwickelt wurde.

Um einen Überblick über die Adsorption der zu untersuchenden Stoffe in der Kieselgelschicht zu bekommen, wurde zuerst mit den reinen Lösungsmitteln Toluol, Dichloräthan, Chloroform, Äther und Aceton entwickelt.

Es zeigte sich, daß die zu untersuchenden Stoffe bei der

Entwicklung mit Toluol oder Dichloräthan fest am Kieselgel adsorbiert bleiben, also nicht desorbiert werden können und daher auf den Startpunkten verbleiben.

Auch bei Chloroform, das ein besseres Lösungsvermögen für die Stoffe besitzt, ist die Adsorption noch zu stark. Zwar werden die Substanzen schon unterschiedlich adsorbiert, doch liegen sie zu dicht gedrängt im unteren Teil der Platte.

Wird mit Äther oder Aceton, worin die Schlafmittel sehr gut löslich sind chromatographiert, so werden die Substanzen nur wenig adsorbiert und liegen alle nahe der Frontlinie.

Da die Stoffe einmal zu stark, das andere Mal zu schwach adsorbiert wurden, mußte nach einem anderen Verfahren gesucht werden. Dazu wurde die Fähigkeit der Barbitale zur Bildung dissoziierter Verbindungen, die in organischen Lösungsmitteln schwerer löslich sind, herangezogen. Die barbitursäurefreien Schlafmittel sollten auf Grund ihres geringen Dissoziationsvermögens eine bessere Löslichkeit zeigen. Auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit der beiden Gruppen waren somit entsprechende Rf-Differenzen zu erwarten.

Für diese Untersuchung wurde ein Laufmittel

Äther : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 verwandt.

Der Versuch zeigte (Abb. 19), daß durch die Einwirkung der NH_3-Gasatmosphäre, in der die Barbitale in die dissoziierte Form überführt werden, die Adsorption dieser Wirkstoffe am Kieselgel stärker wird, und daß dadurch gleichzeitig unterschiedliche Adsorptionen auftreten. Hierbei werden aber die Schlafmittel Bromural, Persedon und Noludar fester adsorbiert, so daß die Differenz zwischen den beiden Gruppen nicht groß genug ist.

Um den Unterschied zwischen den barbitursäurefreien Schlafmitteln und den Barbitalen zu vergrößern, wurde dem oben angeführten Laufmittel 10 % Butanol zugesetzt. Bei diesem Laufmittel

Äther : Butanol : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 : 10

(Abb. 20) wird die Löslichkeit der barbitursäurefreien Sedativa

Abb. 19

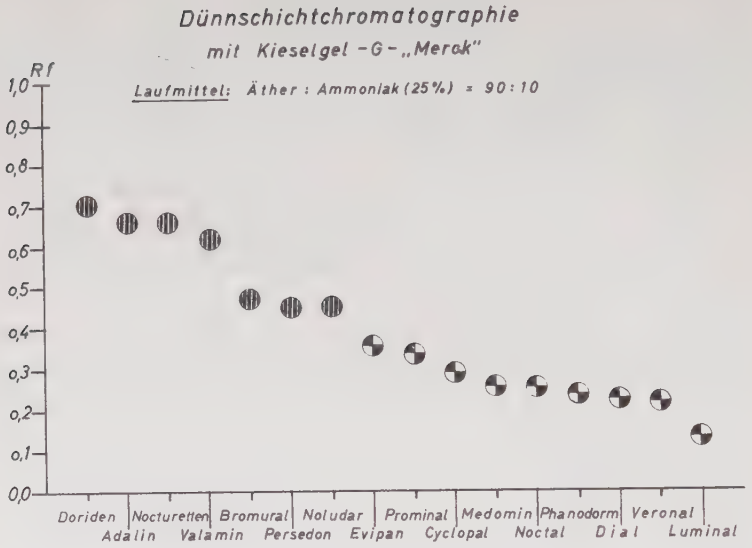
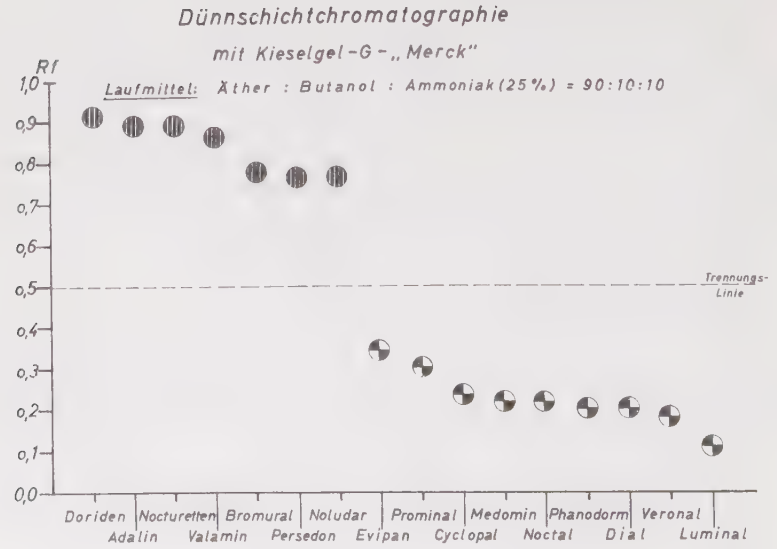

Dünnschichtchromatographie
mit Kieselgel -G- „Merck"
Rf
Laufmittel: Äther : Ammoniak (25%) = 90:10
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Doriden
Adalin
Nocturetten
Valamin
Bromural
Persedon
Noludar
Evipan
Prominal
Cyclopal
Medomin
Noctal
Phanodorm
Dial
Veronal
Luminal

Abb. 20


Dünnschichtchromatographie
mit Kieselgel -G- „Merck"
Rf
Laufmittel: Äther : Butanol : Ammoniak (25%) = 90:10:10
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Trennungs-Linie
Doriden
Adalin
Nocturetten
Valamin
Bromural
Persedon
Noludar
Evipan
Prominal
Cyclopal
Medomin
Noctal
Phanodorm
Dial
Veronal
Luminal

durch den Butanolzusatz stark erhöht und ihre Adsorption wird dadurch sehr gering. Sie liegen dadurch fast an der Fronthöhe, während ein wesentlicher Einfluß auf die Adsorption der Barbitale im Vergleich zu dem ersten angewandten Laufmittel nicht festzustellen ist.

Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist darauf zurückzuführen, daß die Barbitale in stark dissoziierter Form vorliegen und deren Adsorptionsaffinität durch den Butanolzusatz von 10 % noch nicht wesentlich beeinflußt wird, während die barbitursäurefreien Schlafmittel nur noch schwach adsorbiert werden.

Damit ist eine ausreichende Differenz der Rf-Werte zwischen den beiden Gruppen geschaffen, und es läßt sich leicht feststellen, welcher Gruppe der zu untersuchende Stoffe angehört. Alle Schlafmittel, die über der Rf-Trennungslinie 0,5 liegen, gehören der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa darunterliegende den Barbitalen an.

Es wurde ferner untersucht, wie die Verhältnisse bei der Entwicklung mit Chloroform zu verbessern wären, da die Schlafmittel, wie eingangs berichtet, zu nahe an den Startpunkten liegen. Durch einen 10 %igen Butanolzusatz zum Chloroform wird die Adsorption der Schlafmittel wesentlich vermindert, wodurch die Rf-Werte durchweg zu hoch liegen.

Es wurde daher auf die vorhergehenden Erfahrungen zurückgegriffen und ein Laufmittel

Chloroform : Butanol : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 : 10

gewählt.

Auch hier zeigt sich (Abb. 21), daß die barbitursäurefreien Wirkstoffe schwach adsorbiert werden. Auffallend ist, daß Evipan und Prominal weniger stark als die übrigen Barbitale adsorbiert werden. Dieses ist mit der besseren Löslichkeit der N-methylierten Verbindungen in Chloroform gegenüber Äther zu erklären.

Bei diesem Laufmittel kann eine Rf-Trennungslinie bei 0,65 gezogen werden, darüber liegende Rf-Werte sind der Gruppe der barbitursäurefreien Schlafmittel zuzurechnen, darun-

Abb. 21

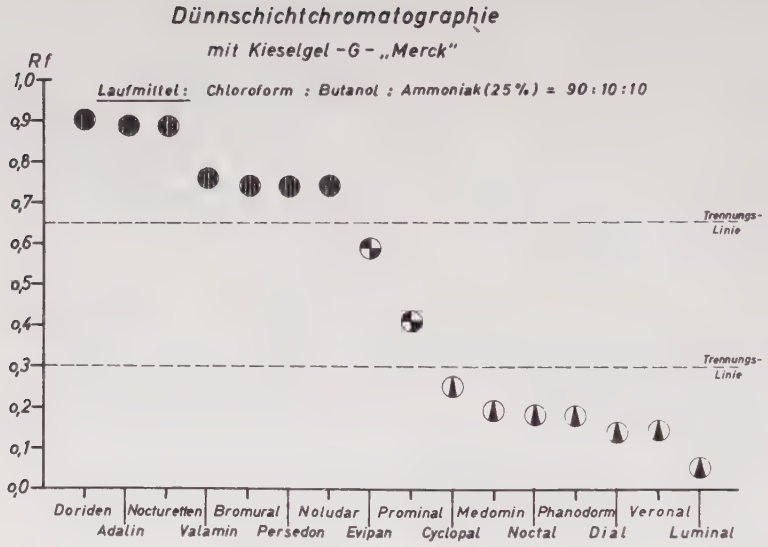
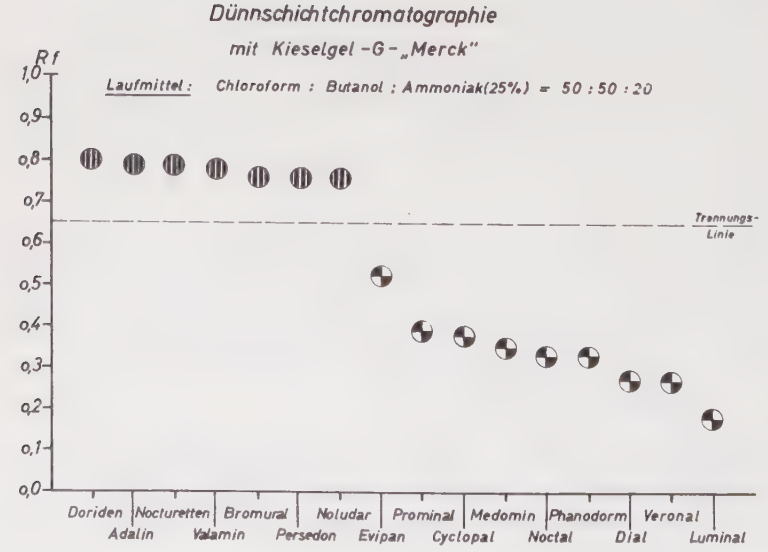

Dünnschichtchromatographie
mit Kieselgel -G- „Merck"
Rf
Laufmittel: Chloroform : Butanol : Ammoniak(25%) = 90 : 10 : 10
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Trennungs-Linie
Trennungs-Linie
Doriden
Adalin
Nocturetten
Valamin
Bromural
Persedon
Noludar
Evipan
Prominal
Cyclopal
Medomin
Noctal
Phanodorm
Dial
Veronal
Luminal

Abb. 22


Dünnschichtchromatographie
mit Kieselgel -G- „Merck"
Rf
Laufmittel: Chloroform : Butanol : Ammoniak(25%) = 50 : 50 : 20
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Trennungs-Linie
Doriden
Adalin
Nocturetten
Valamin
Bromural
Persedon
Noludar
Evipan
Prominal
Cyclopal
Medomin
Noctal
Phanodorm
Dial
Veronal
Luminal

ter liegende den Barbitalen. Wird eine Rf-Trennungslinie bei 0,3 gezogen, so liegen die Rf-Werte von Prominal und Evipan mit in der Gruppe der Nichtbarbitale.

Diese Trennung gewinnt dadurch an Bedeutung, weil bei der in der vorliegenden Arbeit erzielten quantitativen Gruppentrennung der Schlafmittel an der Säule, auch Evipan und Prominal in der Gruppe der barbitursäurefreien Sedative anfallen. Es kann somit schnell in ca. 20 Minuten eine qualitative Gruppenvoranalyse durchgeführt werden, um festzustellen, ob Wirkstoffe der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie Evipan und Prominal oder andere Barbitale vorliegen.

Sollen die einzelnen Schlafmittel qualitativ erfaßt werden, so ist es zum Teil möglich durch die verschiedenen Detektionsmöglichkeiten weiter zu analysieren. Bei manchen Schlafmitteln läßt auch der Rf-Wert eine Aussage zu. Der Rf-Wert-Unterschied ist jedoch bei sehr verwandten Substanzen gering. Da die Stoffe auch geringfügige Rf-Streuungen zeigen können, ist es von Vorteil, Testlösungen von den einzelnen Stoffen mit zu entwickeln, wodurch Fehlschlüsse durch den Vergleich vermieden werden. Vor allem können so bei nahe verwandten Stoffen geringe Adsorptionsunterschiede besser festgestellt werden.

Weitere Versuche ergaben, daß bei einem Laufmittel (Abb.22)

Chloroform : Butanol : Ammoniak (25 %) = 50 : 50 : 20

bei dem ein höherer Butanol- und Ammoniakgehalt vorliegt, auch eine Rf-Trennungslinie bei 0,65 zur qualitativen Trennung der beiden Gruppen gezogen werden kann.

Durch den höheren Ammoniakgehalt werden nämlich Evipan und Prominal stärker in die dissoziierte Form gedrängt, wodurch sie stärker adsorbiert werden und somit trotz des größeren Butanolzusatzes ihre Rf-Werte nicht über diese Trennungslinie zuliegen kommen. Bei den übrigen Barbitalen macht sich der Einfluß des höheren Butanolgehaltes durch geringe Steigung der Rf-Werte bemerkbar. Dadurch wird der Abstand zwischen Prominal und den übrigen Barbitalen geringer und ist nicht so günstig wie beim vorhergehenden System. Da die

Laufstrecke der Barbitale hierbei noch nicht genügend ist, ist der adsorptive Unterschied zwischen den Barbitalen noch gering.

Aus den durchgeführten Untersuchungen geht somit hervor, daß zur qualitativen Gruppentrennung der Barbitale von den barbitursäurefreien Schlafmitteln das Laufmittel

ÄTHER : BUTANOL : AMMONIAK (25 %) = 90 : 10 : 10

am besten geeignet ist, da hierbei die größte Differenz zwischen den Gruppen erreicht wird (Abb. 20).

Soll eine Gruppentrennung verbunden mit einer näheren Aussage über ein Schlafmittel durchgeführt werden, so ist das Laufmittel

CHLOROFORM : BUTANOL : AMMONIAK (25 %) = 90 : 10 : 10

von Vorteil, vor allem auch dann, wenn Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen abgetrennt werden sollen (Abb.21).

Mit diesen beiden Laufmitteln ist es jetzt möglich, eine sichere und schnelle Voranalyse der Gruppen bzw. einzelner Schlafmittelsubstanzen durchzuführen und danach dann eine säulenchromatographische Trennung vorzunehmen.

F. NEUER ANALYSENGANG ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG DER SCHLAFMITTELGRUPPEN AN SÄULEN

Aus den Ergebnissen, die bei den chromatographischen Untersuchungen der therapeutisch wichtigsten Sedativa an Säulen ermittelt wurden, läßt sich ein neuer Analysengang zur quantitativen Auftrennung der Schlafmittelgruppen entwickeln.

Bei einer forensisch-toxikologischen Untersuchung ist danach folgendermaßen vorzugehen:

Das organische Untersuchungsmaterial, in welchem die Schlafmittel vorwiegend in unveränderter Form enthalten sind, wird mit Äthanol (96 %) bei schwacher Erwärmung auf dem Wasserbad extrahiert und das Unlösliche abfiltriert.

Der äthanolische Extrakt wird dann zur Trockne eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit Weinsäure angesäuert. Zur Isolierung der sauren Arzneistoffe wird die wäßrige-weinsaure Lösung zunächst dreimal mit Äther ausgeschüttelt.

Der vereinigte Ätherauszug wird hiernach nach einem im toxikologischen Laboratorium des Institutes geübten Verfahren mit Pufferlösung pH 4,4 zur Abtrennung der stark sauren Verbindungen (Weinsäure, Bernsteinsäure, Salicylsäure) ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und mit Aktivkohle von harnpflichtigen Bestandteilen gereinigt. Sind noch Verunreinigungen vorhanden, so kann noch zusätzlich mit 5 %iger Bleiacetatlösung ausgeschüttelt werden.

Der Ätherauszug wird dann durch Destillation auf ca. 10 ml eingeengt und auf eine vorbereitete Kieselgel-Säule zur weiteren Reinigung aufgebracht. Die Säule ist unter "feuchtem" Einfüllen mit drei Schichten von je 5 g Kieselgel "Merck" (0,2-0,5 mm), wobei die mittlere Schicht noch mit 0,5 g Aktivkohle vermischt wird, zu beschicken. Mit ca. 150 ml Äther wird dann solange eluiert, bis die bräunliche Zone sich kurz vor dem Auslauf befindet.

Aus dem weitgehend gereinigtem Eluat wird der Äther verdampft und das Gewicht des Rückstandes bestimmt. Ein entsprechender Teil dieses Rückstandes wird dann in 5 ml Äther aufgenommen, mit 1,5 g Zellulosepulver verrieben und

der Äther restlos verdampft. Das mit dem Wirkstoff beladene Zellulosepulver wird dann oben auf eine 12g-Zellulose-Säule, die mit einer 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung imprägniert ist, aufgebracht. Durch nachfolgende Entwicklung mit den entsprechenden Lösungsmitteln (s. Tab. 8) werden die Schlafmittel in Gruppen aufgetrennt. (Kap.C.II.c.3. s.Abb. 18).

Um die geeigneten Lösungsmittel für die Gruppentrennungen der Wirkstoffe auswählen zu können, wird zweckmäßig vor der Entwicklung an der Säule mit Hilfe der Dünnschicht- oder Papierchromatographie die Gruppenzugehörigkeiten der Stoffe festgestellt oder auch die einzelnen Substanzen selbst identifiziert.

Für die Prüfung auf die Gruppenzugehörigkeit mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie eignen sich die folgenden Laufmittel (Kap.E.b.3.):

Äther : Butanol : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 : 10

oder zu einer weitergehenden Auftrennung (Abtrennung von Evipan und Prominal):

Chloroform : Butanol : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 : 10

Die Detektion der Barbitale wird mit Quecksilber-I-nitrat, die der Ureide mit der Reagenzienkombination Silbernitrat-Kaliumdichromat-Natronlauge und die der übrigen barbitursäurefreien Wirkstoffe mit den speziellen Reagenzien durchgeführt (Kap.E.b.2.).

Für die papierchromatographische Identifizierung der Barbitale wird, soweit genügend Zeit zur Verfügung steht, am geeignetsten das Laufmittel nach SEIFERT, für die Identifizierung der barbitursäurefreien Schlafmittel das Laufmittel nach GOEBEL mit Toluol:Ammoniak (25 %) = 10:1 Verwendung finden können.

Aus der Voruntersuchung ergibt sich auch, in welcher Konzentration die Wirkstoffe annähernd vorliegen. Die erarbeiteten säulenchromatographischen Trennungen beziehen sich auf Substanzmengen bis zu je 30 mg. Es muß daher die entsprechende Gewichtsmenge des aus dem biologischen Material isolierten Schlafmittelgemisches zur Durchführung der Tren-

nungen eingewogen werden.

Nach dem Ergebnis der Voruntersuchung mit Hilfe der Dünnschicht- und Papierchromatographie werden die entsprechenden Lösungsmittel (n. Tab. 8; Abb. 18) für die Trennung der Schlafmittelgruppen bzw. auch der einzelnen Komponenten zusammengestellt und die Entwicklung mit dem Lösungsmittel geringster Polarität begonnen.

Sind alle trennbaren Schlafmittelgruppen gesondert zu erfassen, so werden zunächst mit 100 ml Toluol die barbitursäurefreien Schlafmittel sowie Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen Medomin, Phanodorm, Noctal, Cyclopal, Luminal, Dial und Veronal abgetrennt.

Die auf der Säule verbliebenen Barbitale werden dann je nach der vorhandenen Menge an Luminal und Dial mit dem entsprechenden Lösungsmittelvolumen von Chloroform zur Elution von Medomin, Phanodorm, Noctal und Cyclopal weiter entwikkelt.

Liegen ca. 10 mg Luminal oder Dial (Veronal kann bis zu 30 mg vorliegen) vor, so werden die oben genannten Barbitale nach der Toluol-Entwicklung mit 130 ml Chloroform von Luminal, Dial und Veronal abgetrennt. Sind jedoch höhere Wirkstoffmengen bis ca. 30 mg Luminal oder Dial vorhanden, so muß zur sicheren Trennung dieser beiden Gruppen erst mit 60 ml Chloroform und danach mit 60 ml Toluol entwickelt werden. Es kann aber auch bei letzterem nur mit 90 ml Chloroform eluiert werden, doch ist dabei nur eine annähernd quantitative Trennung möglich, da hierbei eine geringe Überschneidung der Zonenränder erfolgt.

Luminal, Dial und Veronal werden dann anschließend aus der Säule mit 130 ml Äther eluiert. (s.Kap.C.II.c.2.3.)

Die stärker sauren und gut wasserlöslichen Abbauprodukte verbleiben nach dieser Entwicklung immer noch auf der Säule und können mit 70 %igem Äthanol eluiert werden. Dabei wird aber auch das Natriumkarbonat der stationären Phase mit ausgewaschen. Nach dem Eindampfen des Eluates zur Trockne wird daher der Rückstand mit 5 ml Wasser aufgenommen, auf pH 2 angesäuert und mit 50 ml Äther ausgeschüttelt. Im Ver-

dampfungsrückstand können dann die Abbauprodukte papierchromatographisch identifiziert werden. (Kap.D.b.2.)

Zur Auftrennung der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa wird das Toluol des Eluates aus der Zellulose-Säule verdampft und der Rückstand auf eine zweite Zellulose-Säule mit einer stationären Phase von 5 ml 0,25m-Natriumkarbonatlösung aufgebracht. Durch Entwicklung mit 60 ml Cyclohexan werden Doriden und Adalin, mit 60 ml Cyclohexan:Toluol = 10:4 Valamin und Noludar und anschließend mit 100 ml Toluol (oder Chloroform) Bromural, Persedon, Evipan und Prominal aus der Säule eluiert. (Kap.C.II.c.2.)

Evipan und Prominal werden von Bromural an einer Säule mit 5 g saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I "Woelm", die mit 25 ml einer Mischung von Äther mit 2 % Eisessig (96 %) vorbehandelt wird, abgetrennt. Hierzu wird das Lösungsmittel des Eluates aus der Zellulose-Säule verdampft, der Rückstand in 1-2 ml Äther aufgenommen und auf die Aluminiumoxydsäule aufgebracht. Bei Entwicklung mit 50 ml Äther werden Evipan und Prominal von Bromural, das nachfolgend mit Äthanol eluiert wird, abgetrennt. (Kap.B.II.b.2.γ.)

Liegen nur je 10 mg der Barbitale vor, so kann die Trennung durch Entwicklung mit Dichloräthan vorgenommen werden. (Kap.C.II.c.2.)

Die genannten Gruppentrennungen können auch nur an einer Säule erfolgen, da die stationären Phasen an beiden Säulen gleich sind. Dies kommt vor allem dann in Frage, wenn die Zahl der Wirkstoffe klein ist und wenn aus jeder Gruppe etwa nur ein Wirkstoff vorliegt.

Diese Möglichkeit wird bei den toxikologisch-chemischen Untersuchungen recht häufig vorkommen, so daß die Trennungen gewöhnlich nur an einer Säule unter Anwendung der entsprechenden Lösungsmittel ausgeführt werden können.

Diesem Trennungsverfahren kommt bei der quantitativen Ermittlung der Sedativa eine ausreichende Trennschärfe zu, so daß damit für die forensische Toxikologie eine genügende Sicherheit der Analyse gegeben ist.

Diesen allgemeinen Richtlinien für den neuen Analysengang soll sich noch folgender spezieller Hinweis anschließen:

Geeignete Verfahren zur Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen ergeben sich auch an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" bei Entwicklung mit einem Äther-Äthanol-Gemisch oder mit Chloroform.

Verschiedene Trennungen der einzelnen Wirkstoffe sind ferner an Aluminiumoxyd-Säulen durchführbar. So können Bromural von Adalin, die Barbitale von den Ureiden, Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen getrennt werden.

Die adsorptionschromatographischen Trennungen verlangen eine genaue Einhaltung der Bedingungen, vor allem in Bezug auf das zur Anwendung gelangende Aluminiumoxyd einer genau einzuhaltenden Aktivitätsstufe. Diese muß durch vorhergehende Testversuche überprüft werden.

Zusammenfassung:

1. Es wurde die Adsorption der Schlafmittel an saurem und basischem Aluminiumoxyd "Woelm" verschiedener Aktivitätsstufen bei Entwicklung mit Äther und Chloroform untersucht.
   Die Untersuchungen wurden im Hinblick auf eine quantitative Trennung von Schlafmittelgruppen chromatographisch an Säulen durchgeführt. Die Ergebnisse führten zu folgenden neuen adsorptionschromatographischen Trennungen an Aluminiumoxyd-Säulen:
   a. Abtrennung der Barbitale von den Ureiden und halbquantitative Trennung von Doriden, Valamin, Persedon und Noludar von den Ureiden an saurem Aluminiumoxyd Akt.St.I "Woelm", das mit Äther-Eisessig vorbehandelt wird, durch Entwicklung mit Äther.
   b. Abtrennung von Adalin, Valamin und Doriden von den Barbitalen und von Bromural an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit Äther.
   c. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel von allen Barbitalen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit einem Äther-Äthanol-Gemisch.
   d. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie Evipan und Prominal von allen übrigen Barbitalen an basischem Aluminiumoxyd Akt.St.III "Woelm" durch Entwicklung mit Chloroform.

2. Die erhaltenen Resultate berechtigen zu der Folgerung, daß noch weitere Trennungen von Schlafmittelgemischen mit Hilfe der Adsorptionschromatographie durchführbar sind. Positive Ergebnisse wären vor allem mit geringer aktiven basischen Adsorbentien bei Entwicklung mit apolaren Lösungsmitteln wie Dichloräthan oder Toluol zu erwarten.

3. Es wurde der Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf das Adsorbens und die Aktivitätseinstellung im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Trennungen überprüft.
   Die forensisch-toxikologische Verwertung der adsorptionschromatographischen Verfahren setzt eine genaue Einstellung der Aktivität durch Vornahme eines Testversuches mit

den zur Untersuchung kommenden Stoffen voraus.

4. Für die Verteilungschromatographie an Säulen wurden die Einflüsse der variablen Größen untersucht und daraus optimale Bedingungen für die Trennung von Schlafmitteln abgeleitet.

   Als Träger einer Natriumkarbonat enthaltenden stationären Phase wurde Kieselgel."Merck" (0,2-0,5 mm) auf seine Eignung zur Gruppentrennung der Schlafmittel überprüft. An einer 40g-Kieselgel-Säule mit einer stationären Phase von 2m-Natriumkarbonatlösung konnte durch Entwicklung mit Dichloräthan eine Trennungsmöglichkeit der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen aufgezeigt werden. Neben der reinen Verteilung war hierbei eine Adsorption der Wirkstoffe nicht auszuschließen.

5. Durch verteilungschromatographische Untersuchungen der Schlafmittel an Zellulosepulver, das mit einer stationären Phase von 0,25m-Natriumkarbonatlösung imprägniert war, wurden die folgenden neuen Trennverfahren ausgearbeitet.

   a. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie von Evipan und Prominal von allen übrigen Barbitalen und eine teilweise Auftrennung der Barbitale durch Entwicklung mit Dichloräthan bis zu Barbitalmengen von je 10 mg.

   b. Abtrennung der barbitursäurefreien Schlafmittel sowie von Evipan und Prominal von den übrigen Barbitalen in Substanzmengen bis zu je 30 mg durch Entwicklung mit Toluol.

   c. Auftrennungen in der Gruppe der barbitursäurefreien Schlafmittel. Am Beginn der Entwicklung werden mit Cyclohexan Doriden und Adalin eluiert, danach mit dem Gemisch Cyclohexan:Toluol=10:4 Valamin und Noludar und schließlich mit Toluol Bromural, Persedon, Evipan und Prominal.

   d. Abtrennung von Medomin, Cyclopal, Phanodorm und Noctal von der Gruppe Luminal, Dial und Veronal in Mengen bis zu je 30 mg durch Entwicklung mit Chloroform, (Toluol) und Äther.

6. Aus den Untersuchungen an der Zellulose-Säule ergab sich ein Trennungsgang zur sicheren quantitativen Trennung von Schlafmittelgruppen.
Trennung der Gruppe der barbitursäurefreien Schlafmittel von den Barbitalen durch Entwicklung mit Toluol.
Auftrennung der Barbitalgruppe mit Chloroform in zwei Untergruppen:
Medomin, Phanodorm, Cyclopal und Noctal
Luminal, Dial und Veronal
Auftrennungen in der Gruppe der barbitursäurefreien Sedativa mit den unter 5.c. angegebenen Lösungsmitteln.

Durch geeignete Auswahl der angegebenen Lösungsmittel kann der Trennungsgang den jeweils vorliegenden Substanzen angepaßt werden.

7. Zur Isolierung der Schlafmittel und deren Abbauprodukten aus großen Harnmengen wurde eine Extraktionsmethode und ein Reinigungsverfahren an einer Kieselgel-Säule erprobt.

8. Mit den aus Harnen nach der Einnahme von Phanodorm isolierten Substanzen wurden säulenchromatographische Untersuchungen zur Trennung der Abbauprodukte der Schlafmittel von den unveränderten Substanzen durchgeführt. An Zellulose-Säulen mit einer stationären Phase von pH 8 bzw. 10,8 wurden durch Entwicklung mit Chloroform bzw. mit Äther positive Ergebnisse erzielt. Die Versuche lassen vermuten, daß ähnliche Trennungen auch bei anderen Schlafmitteln möglich sein werden.

9. Für die qualitative Voruntersuchung auf Schlafmittel wurden neue Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie ermittelt und die Detektion der Substanzen auf der Kieselgelplatte untersucht. Die Gruppentrennungen hierzu wurden mit den folgenden Laufmitteln erreicht:
Äther : Butanol : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 : 10
Chloroform : Butanol : Ammoniak (25 %) = 90 : 10 : 10
Es ist dadurch möglich in ganz kurzer Zeit (30 Minuten) die Gruppenzugehörigkeit eines Schlafmittels festzustellen.

10. Die Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse führte zu einem für die forensische Toxikologie gut brauchbaren neuen chromatographischen Analysengang zur quantitativen Trennung von Schlafmittelgruppen und in Sonderfällen auch zur Trennung einzelner Schlafmittel.

Literaturverzeichnis

Aspelund, H. und L. Skoglund:	Acta Acad. aboensis 10 / 10 / (1937)
Autenrieth, W. und K.H. Bauer:	"Die Auffindung der Gifte und stark wirkender Arzneimittel zum Gebrauch im chemischen Laboratorium" Steinhoff, Dresden und Leipzig 6. Auflage (1943)
Bamann, E. und E. Ullmann:	"Chemische Untersuchungen von Arzneigemischen, Arzneimitteln und Giftstoffen", Jantsch, Günzburg (1951)
Bandes, D.:	J.Amer.pharmac. Assoc.sci. Edit. 43 / 580 / (1954)
Barry, G.T. et al.:	J. Biol. Chem. 174 / 209 / (1948)
Bettschart, A.:	"Über die Eignung chromatographischer Verfahren für die Trennung von Alkaloidgemischen unter besonderer Berücksichtigung der Tropin- und Opiumalkaloide", Inaug.-Diss., E T H Zürich (1954)
Bettschart, A. und H. Flück:	Pharm. Acta Helv. 31 / 260 / (1956)
Böhme, H.:	Dtsch. Apoth. Ztg. 94 / 365 / (1954)
Böhme, H. und H. Lampe:	Arch. Pharm. 284 / 227 / (1951) Arch. Pharm. 285 / 175 / (1952)
Böhme, H. und R. Strohecker:	Arch. Pharm. 285 / 422 / (1952 c)
Böhme, H. und R. Strohecker:	Arzneimittel-Forsch. 3 / 468 / (1953 a) Arzneimittel-Forsch. 3 / 236 / (1953 b)
Bräuninger, H. und B. Stens:	Pharmazie 12 / 794 / (1957)
Brimley, R.C. und F.C. Barrett:	"Practical Chromatography", Chapmann & Hall, London (1953)

Brockmann, H.:	Angew. Chem. 53 / 384 / (1940)
Brockmann, H. und H. Schodder:	Ber. dtsch. chem. Ges. 74 / 73 / (1941)
Brockmann, H. und F. Volpers:	Chem. Ber. 82 / 95 / (1949)
Brownlee, G.W.:	Quart. J. Pharm. Pharmacol. 18 / 163 / (1945)
Büchi, J. und X. Perlia:	Pharm. Act. Helv. 29 / 183 - 199 / 265 - 276 / 290 - 310 / (1954)
Büchi J. und M. Soliva:	Pharm. Acta Helv. 30 / 154 - 174 / 195-210/265-276/297-320/ (1955)
Carless, I.E.:	J. Pharm. Pharmacol. 5 / 883 / (1953)
Cassidy, H.G.:	"Adsorption and Chromatography", Interscience, New York 1951
Christensen, V.A.:	Dansk Tidsskr. Farm. 18 / 105/ (1944)
Cramer, F.:	"Papierchromatographie", Chemie GmbH., 3. Ausg. Weinheim 1954
Darlton und Bradbury:	Analyt. Chem. 27 / 67 / (1955)
Decker, P.:	Pharmazie 8 / 371,477 / (1953)
Deininger, R.:	Arzneimittel-Forsch. 5 / 472 / (1955)
Dietzel, R. und P. Tunmann:	"Anleitung zur Analyse organischer Arzneimittel", 2. Aufl., Schmiedel, Stuttgart (1949)
Dressler, H., M. Müller und H. Schönfeld:	Arch. Toxikol. 17 / 286 / (1959)
Evans, W.C. und M.W.Partridge:	Quart. J. Pharm. Pharmacol. 21 / 126 / (1948) J. Pharm.Pharmacol 1 / 593 / 1949 J. Pharm.Pharmacol 4 / 769 / 1952
Fischer, R. und H. Frank:	Scienta Pharm. 16 / 38 / (1948)

Fischer, R. und E. Buchegger:	Pharm. Zentralbl. 89 / 146 / (1950)
Fischer, R. und W. Iwanoff:	Arch. Pharm. 281 / 361 / (1943)
Gabon, J.N.:	Chem. Zbl. 1. 1182 (1948) (Ost)
Gadamer, J.:	"Lehrbuch der chemischen Toxikologie", Göttingen, 2. Aufl. (1924)
Goebel, K.:	"Über die Ausscheidung von Schlafmitteln mit dem menschlichen Harn und den Nachweis ihrer Ausscheidungsprodukte", Inaug.-Diss., an der Freien Univ. Berlin (1960)
Goldbaum, L.R.:	Analyt. Chemistry 24 / 1604 / (1952)
Goldschmidt, S. W. Lamprecht und E. Helmreich:	Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 292 / 125 / (1953)
Graf, E. und E. Neuhoff:	Arzneimittel-Forsch. 4 / 397 / (1954)
Graf, E.:	Arzneimittel-Forsch. 1 / 257 / (1951)
Hanes, C. et alt.:	Nature 164 / 1107 / (1949)
Hais, I.M. und K. Macek:	"Handbuch der Papierchromatographie", Bd. 1, Fischer, Jena 1958
Hesse, G.:	"Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium mit besonderer Berücksichtigung der chromatographischen Adsorptionsanalyse (Tswett-Analyse)", W. de Gruyter, Berlin (1943)
Hesse, G.:	Angew. Chem. 59 / 280 / (1947)
Hesse, G.:	Chemiker-Ztg. 74 / 643, 647 / (1950)
Hesse, G.:	Angew.Chem. 67 / 9 / (1955)
Hesse, G., I. Daniel und G. Wohlleben:	Angew. Chem. 64 / 103 / (1952)

Hesse, G. und O. Sauter:	Naturwiss. 34 / 250,251/(1947)
Hoppe - Seyler / Thierfelder:	"Handbuch der physiolog. - und patolog.-chem. Analyse", 122 / 1. Bd., Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1953)
Horner, L. et alt.:	Z. elektrochem. 56 / 987 / (1952)
Hübner, G. und E. Pfeil:	Hoppe-Seyler's Z.physiolog. Chem. 296 / 225 / (1954)
Hunter und Nash:	J. Soc. Chem. Ind. Lond. 51 / 285 / (1932)
Jensen, K.B. und A.B. Svendsen:	Pharm. Acta Helv. 25 / 21 /(1950)
Kaiser, H. und W. Lang:	Pharm. Ztg. 91 / 281 / (1952)
Karrer, P.:	"Lehrbuch der org. Chemie", 534, Thieme (1950)
Kondo:	Journ. pharmac. Soc. Jap. Trans. 57 / 218 / (1937)
Kubli, H.:	"Zur Kenntnis der polaren Adsorption, insbesondere von anorganischen Ionen an vorbehandelter Tonerde", Inaug.-Diss. ETH-Zürich (1945)
Kubli, H. und E. Schmid:	Helv. chim. Acta 27 / 213 / (1945)
Kuhn, R. und H. Brockmann:	Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 200 / 255 / (1931)
Kuhn, R. und E. Lederer:	Ber. dtsch. chem. Ges. 64 / 1349 / (1931)
Kuhn, R., A. Winterstein und E. Lederer:	Hoppe-Seyler's Z.physiolog. Chem. 197 / 141 / (1931)
Lach, J.L., Bhansali, K. und S.M.Blaug:	J. Amer. pharm. Assoc. sci. Edit. 47 / 48 / (1958)

Lang, W.:	Arzneim.-Forsch. 1 / 314 / (1951)
Lang, W. und H. Stephan:	Südd. Apoth. Ztg. 90 / 739 / (1950)
Lederer, E. und M. Lederer:	"Chromatography", Elsevier, Amsterdam (1953)
Lennartz:	Angew. Chem. 59 / 158 / (1947)
Levi und Castelli:	Annales Farm. Bioquim. 11 / 6 / (1940)
Lüdy-Tenger, F.:	Pharm. Acta Helv. 8 / 385 / (1944)
Lüdde, K.H.:	Arch. Pharm. 289 / 111 / (1956)
Madsen:	Dansk. Tidsskr. Farmac. 8 / 62 / (1934)
Martin:	Partition Chromatography, Biochemical. Soc. Symposia 3 / (1951)
Martin, A. J.P. und R.L.M. Synge:	Biochem. J. 35 / 1358 / (1941)
Mainert, E.W. und H.B. van Dyke:	Science 110 / 661 / (1949)
Meites, S.:	Clin. Chemistry 3 / 263 / (1957)
Merck, E.- A.G.:	"Chromatographie", Darmstadt 1959
Merz, K.W. und R. Frank:	Arch. Pharm. 275 / 345 / (1937)
v. Metzsch, F.A.:	Angew. Chem. 65 / 586 / (1953)
Mohrschulz, W.:	Arch.Pharm. 289 / 508 / (1956)
Mühlemann, H. und A. Bürgin:	"Qualitative Arzneimittelanalyse", Reinhardt, Basel (1951)
Müller, P.B.:	Helv. Chem. Acta 26 / 1945 : (1943)
Neher, R.:	Chromatographic Reviews, I, (1958)
Nielsen,:	Dansk. Tidsskr. Farmac. 7 / 137 / (1953)
van Os, D.J.:	J. Pharm. Pharmacol. 1 / 55, 350 / (1949)
Otto, F.J.:	Ann. Chem. 100 / 44 / (1856)

Paulus, W. und H.J. Mallach:	Arzneimittel-Forsch. 4 / 391 / (1954)
Paulus, W. und O. Pribilla:	Arzneimittel-Forsch. 3 / 478 / (1953)
Pearson, R.M.:	Analyst., 80 / 656 / (1955)
Pöhm, M. und N. Wichtl:	Sciencia Pharm. 23 / 31 / (1955)
Pribilla, O.:	Arch. Toxikol. 18 / 1-86 / (1959)
Rauen, H.M. und W. Stamm:	"Gegenstromverteilung", Springer, Berlin 1953
Reimers, F. et alt.:	Dansk. Tidsskr. Farm. 19 / 129 / (1945)
Röck, H.:	"Ausgewählte moderne Trennverfahren zur Reinigung org. Stoffe", Steinkopff, Darmstadt, (1957)
Rosenthaler, L.:	"Qualitative Pharmazeutische Analyse", Enke, Stuttgart, (1922) "Nachweis organischer Verbindungen", Enke, 2. Auflg., Stuttgart, (1923)
Ruhkopf, H.:	Ber.Dtsch.chem.Ges. 73 / 938 / (1940)
Sabalitzschka, Th.:	"Anleitung zum chemischen Nachweis der Gifte", Berlin und Wien, (1923)
Sabatino, F.J.:	J. Ass. off. agric. Chem. 37 / 1001 / (1954)
Sansoni, B.:	Chemiker-Ztg. 78 / 580 / (1954)
Scheibl, F.:	Arch. Toxikol. 17 / 357 / (1959)
Schmidt, G.:	Arch. Toxikol. 17 / 93 / (1958)
Schultz, O.E.:	Dtsch.Apoth.Ztg. 33 / 969 / (1960)
Schwab, G.M. und K. Jockers:	Angew. Chem. 50 / 546 / (1937)
Seifert, R.:	Arzneimittel-Forsch. 7 / 413 / (1956)

Stahl, E.:	Chemiker-Ztg. 82 / 323 / (1958) Arch. Pharm. 8 / 9 / 411-416 / (1959) Pharm. Rundschau 2 / 1-6 / (1959)
Stas, J.:	Ann. Chem. 84 : 379 / (1852)
Staudinger, H.:	"Anleitung zur organischen qualitativen Analyse", Springer, Berlin, 5. Auflg. 1948
Strain, H.H.:	"Chromatographic Adsorption Analysis", New York, 1942
Strebel:	"Untersuchungen über die Vakuum-Mikrosublimation neuer synthetischer Arzneistoffe und ihre Identifizierung der Sublimate", Inaug.-Diss., ETH-Zürich, 1950
Thies, H.:	Arch. Pharm. 285 / 224 / (1952)
Thies, H. und S. Zauner:	Arch. Pharm. 285 / 191, 360 / (1952)
de Tiege-Robinet, S. und Ch. Lapiere:	J. Pharm. Belg. 13 / 437 / (1958)
Tswett, M.S.:	Berichte dtsch. bot. Ges. 24 / 316, 384 (1906)
Tunmann, P. und W. Hubmann:	Arch. Pharm. 287 / 281 / (1954)
Turba, F.:	"Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie", Springer, Berlin 1954
Valentin, H.:	Südd. Apoth. Ztg. 90 / 500 / (1950)
Valentin, H. und G. Kirchübel:	Arch. Pharm. 284 / 144 / (1951)
Valentin, H. und G. Kirchübel:	Dtsch. Apoth. Ztg. 92 / 324 / (1952)
Valentin, H. und K. Luthardt:	Pharmazie 9 / 550 / (1954)
Valentin, H. und K. Luthardt:	Pharmazie 10 / 600 / (1955)

Vidic, E.:	Arzneimittel-Forsch. 8 /719 / (1958)
Vidic, E.:	Arch. Toxikol. 17 / 373-386 / (1959)
Völksen, W.	Pharm. Ztg. 35 / 1029 / (1960)
Winterfeld, K.:	"Praktikum der organisch-präparativen pharmazeutischen Chemie und Leitfaden der chemischen Arzneimittelanalyse", Steinkopff, Dresden u. Leipzig, 3. Auflg. 1950
Woelm, M.:	"Chromatographie mit Aluminiumoxyden", Woelm, Eschwege, Al 7
Wohlleben, G.:	Angew. Chem. 68 / 752 / (1956)
Wohlleben, G.:	Pharm. Ztg. 102 / 562 / (1957)
Zahner, R.J. und W.B. Swann:	Analyt. Chemistry 23 / 1093 / (1951)
Zechmeister, L.:	"Progress in Chromatography 1938-1947", Chapmann a.Hall, London 1950
Zechmeister, L. und L.F. Cholnocky:	"Die chromatographische Adsorptionsmethode", Springer, Wien, 2. Aufl., 1938
Zwikker, J.J.L.:	Pharm. Weekbl. 68 / 975 / (1930)

L e b e n s l a u f

Am 8. April 1932 wurde ich als Sohn des Verwaltungssekretärs Alfred Weidmann und seiner Ehefrau Wally geb. Schwiegk in Leipzig geboren.

In Rochlitz in Sachsen besuchte ich die Grundschule und wurde im Jahre 1943 in die Rochlitzer-Oberschule eingeschult. Hier bestand ich im Juni 1951 die Reifeprüfung und begann im gleichen Jahr meine Ausbildung als Apothekerpraktikant in der Adler-Apotheke in Burgstädt/Sachsen. Nach zwei Jahren legte ich in Dresden mein Vorexamen mit der Note "gut" ab.

Im W.-Semester 1954 konnte ich an der Technischen Universität Berlin-Charlottenburg das pharmazeutische Studium beginnen. In den ersten beiden Semestern meines Studiums waren Prof. Jander und Prof. Jahr (Anorg. Chemie) Prof. Melchior (Allgem. Botanik), Prof. Stranski (Physik. Chemie), Prof. Nerdel (Org. Chemie), Prof. Boersch (Exper.Physik) und Dr. Blasius (Analyt. Chemie) meine Lehrer.

Die vier weiteren Semester studierte ich an dem pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin-Dahlem, wo ich vor allem mein pharmazeutisches Wissen erweitern konnte. Meine Lehrer in dieser Zeit waren die Professoren Schenck und Schulte (Pharmaz. Chemie und Untersuchungsmethoden), Prof. Hänsel (Pharmakognosie), Prof. Werdermann (System. Botanik), Prof. Drawert (Allgem. Botanik), Prof. Vidic (Chem. Toxikologie), Prof. Fischer und Prof. Schütte (Physiologie), Prof. Rommeney und Dr. Brennhausen (Gesetzeskunde) und Dr. Koransky (Pharmakologie).

Im November 1957 bestand ich das pharmazeutische Staatsexamen mit der Note "gut" und erhielt nach einem Jahr die Approbation als Apotheker.

Nach meinem Studium begann ich im S.-Semester 1958 mit meiner Dissertation "Untersuchungen über die chromatographische Auftrennung von Schlafmittelgruppen mit besonderer Berücksichtigung der Trennung der Barbitale von anderen Sedativa" unter Leitung von Professor Dr. Ing. E. Vidic im

Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin-Dahlem.

Während dieser Zeit konnte ich meine Kenntnisse in pharmazeutischer und toxikologischer Chemie, Pharmakologie, Physiologie und Gerichtsmedizin erweitern.

Berlin, im November 1960

Fotodruck Arno Brynda, Berlin W 35